



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA PARA EL AISLAMIENTO DE METABOLITOS ACTIVOS A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES.”**

**Tesis previa a la obtención del Título de Bioquímica Farmacéutica**

**AUTORA:**

Fernanda Tatiana Zamora Amores

C.I. 0106604333

**TUTORA:**

Dra. Nancy Mirian Cuzco Quizhpi MGT

C.I. 0301624854

**ASESOR:**

Dr. Fabián León Tamariz PhD

C.I. 0102311610

**Cuenca – Ecuador**

**2017**

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación pretendió estandarizar la metodología de cromatografía de columna, para lo cual se realizó una marcha fitoquímica general de la especie *Desmodium adscendens* mediante cromatografía en capa fina (TLC), obteniéndose resultados positivos para los metabolitos activos flavonoides y terpenos. El fraccionamiento de cromatografía de columna se enfocó en la obtención de cantidades representativas de flavonoides debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes conocidas, usando las siguientes variables: selección de la fase móvil y la carga de columna.

Los extractos metanólicos secos libres del exceso de clorofila de la especie antes mencionada, fueron eluidos en las columnas con fases móviles de características polares y apolares y con una carga de 2,5% y 5%, cada fracción colectada fue evaluada en un análisis TLC obteniéndose como resultados que los flavonoides poseen mayor afinidad por la fase móvil polar y que la carga de columna con mejor eficacia y resolución es la de 2,5%. Finalmente, las fracciones cualitativamente idénticas correspondientes a los flavonoides fueron unidas para calcular su rendimiento final y para realizar el análisis de su actividad antioxidante, dando positividad a la misma con DPPH.

La cromatografía de columna resultó ser una técnica poco confiable probablemente por la influencia de factores ambientales como la temperatura inter-día e intra-día por lo que no fue posible la estandarización de la metódica.

**Palabras clave:** Cromatografía de columna, estandarización, TLC, metabolitos secundarios.



## ABSTRACT

The present research aimed to standardize the methodology of column chromatography, for which a general phytochemical march of the species *Desmodium adscendens* was performed by thin layer chromatography (TLC), obtaining positive results for the active metabolites flavonoids and terpenes. The fractionation of column chromatography focused on obtaining representative amounts of flavonoids due to their known anti-inflammatory and antioxidant properties, using the following variables: mobile phase selection and column loading.

The free dry methanolic extracts of the chlorophyll excess from the aforementioned species were eluted in the columns with mobile phases of polar and nonpolar characteristics and with a load of 2.5% and 5%, each fraction collected was evaluated in a TLC analysis Obtaining as results that the flavonoids possess greater affinity for the polar mobile phase and that the column load with better efficiency and resolution is 2.5%. Finally, the qualitatively identical fractions corresponding to the flavonoids were united to calculate their final yield and to perform the analysis of their antioxidant activity, giving positivity to the same with DPPH.

Column chromatography turned out to be an unreliable technique probably due to the influence of environmental factors such as the inter-day and intra-day temperature, so it was not possible to standardize the method.

**Key words:** Column chromatography, standardization, TLC, extraction, secondary metabolites.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO I.....	15
1 MARCO TEÓRICO .....	15
1.1 <i>DESMODIUM ADSCENDENS</i> .....	15
1.1.1 TAXONOMÍA .....	15
1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA .....	15
1.1.3 HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN.....	16
1.2 METABOLISMO VEGETAL .....	16
1.2.1 METABOLITOS PRIMARIOS .....	16
1.2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS .....	16
1.3 TERPENOS.....	17
1.3.1 CLASIFICACIÓN.....	18
1.3.2 FUNCIONES.....	18
1.4 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	19
1.4.1 CLASIFICACIÓN.....	19
1.4.1.1 Flavonoides .....	20
1.4.1.2 Lignanós .....	20
1.4.1.3 Taninos .....	21
1.4.1.4 Cumarinas .....	22
1.4.2 FUNCIONES.....	22
1.5 COMPUESTOS NITROGENADOS .....	23
1.5.1 CLASIFICACIÓN.....	23
1.5.2 FUNCIONES.....	23
1.6 CROMATOGRAFÍA.....	24
1.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .....	25
1.7.1 FASE ESTACIONARIA .....	26
1.7.2 SELECCIÓN DEL SOLVENTE (FASE MÓVIL) .....	26
1.7.3 MISCIBILIDAD.....	28
1.8 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.....	29
1.8.1 FACTORES NECESARIOS EN LA CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA.....	29
1.9 RADICALES LIBRES .....	30
1.10 ANTIOXIDANTES.....	31
1.11 DPPH .....	31
CAPÍTULO II.....	31
2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
2.1 LOCALIZACIÓN .....	32
2.2 MATERIALES.....	32
2.2.1 MATERIA PRIMA .....	32
2.2.2 MATERIALES, SOLVENTES Y REACTIVOS .....	32
2.2.3 EQUIPOS.....	33
2.3 MÉTODOS .....	34
2.3.1 RECOLECCIÓN, LAVADO Y SECADO.....	34
2.3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS.....	35
2.3.2.1 Percolación.....	35
2.3.2.2 Concentración de extractos y Liofilización .....	36
2.3.2.3 Envasado .....	37
2.3.3 DESENGRASADO DE EXTRACTO .....	37
2.3.4 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC).....	38
2.3.4.1 Activación y rotulado de las placas de TLC .....	38
2.3.4.2 Preparación y siembra de la muestra.....	38
2.3.4.3 Preparación de la Fase Móvil .....	38



2.3.4.4	Elución y revelado de las placas .....	38
2.3.5	CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA .....	41
2.3.5.1	Selección y relleno de la columna cromatográfica.....	41
2.3.5.2	Tratamiento de la muestra.....	41
2.3.5.3	Fraccionamiento de columnas según la polaridad y la carga de columna .	41
2.3.6	DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON REVELADOR DE DPP .....	44
CAPÍTULO III.....		44
3	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	45
3.1	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS.....	45
3.1.1	AGOTAMIENTO DE LA DROGA .....	45
3.1.2	RENDIMIENTO DE LA DROGA .....	47
3.2	IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC) .....	48
3.2.1	ALCALOIDES.....	48
3.2.2	FLAVONOIDES .....	49
3.2.3	SAPONINAS.....	50
3.2.4	CUMARINAS .....	51
3.2.5	TERPENOS .....	52
3.3	CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA .....	52
3.3.1	SELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL.....	52
3.3.1.1	Elución de Clorofila .....	53
3.3.1.2	Elución de metabolitos .....	55
3.3.1.3	Elución Total .....	59
3.3.1.4	Miscibilidad .....	59
3.3.2	CARGA DE COLUMNA.....	67
3.3.3	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS .....	72
3.4	DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON DPPH .....	73
CAPÍTULO IV.....		75
4	CONCLUSIONES .....	75
CAPÍTULO V.....		76
5	RECOMENDACIONES .....	76
BIBLIOGRAFÍA.....		77
ANEXOS.....		80



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Taxonomía de <i>Desmodium adscendens</i> .....	15
<b>Tabla 1.2</b> Clasificación según su estructura de los principales tipos de terpenos .....	18
<b>Tabla 1.3</b> Clases importantes de los compuestos fenólicos .....	19
<b>Tabla 1.4</b> Clasificación según la estructura de los compuestos nitrogenados .....	23
<b>Tabla 1.5</b> Fuerza eluotrópica de Solventes .....	27
<b>Tabla 3.1</b> Cálculo del agotamiento de los metabolitos activos de la droga fresca .....	46
<b>Tabla 3.2</b> Cálculo del agotamiento de los metabolitos activos de la droga seca en horno .....	46
<b>Tabla 3.3</b> Cálculo del agotamiento de los metabolitos activos de la droga seca por liofilización .....	46
<b>Tabla 3.4</b> Cálculo del rendimiento del extracto <i>Desmodium adscendens</i> .....	47
<b>Tabla 3.5</b> Documentación de los Rf en la Columna Polar 1 .....	63
<b>Tabla 3.6</b> Documentación de los Rf en la Columna Apolar 3 .....	66
<b>Tabla 3.7</b> Documentación de los Rf en la Columna Polar 7 con carga de columna del 5% .....	71
<b>Tabla 3.8</b> Fluorescencias fotodocumentadas en las fracciones unidas de la columna 1 ... ..	72
<b>Tabla 3.9</b> Cuantificación de analitos en mg .....	73
<b>Anexo A.</b> Envasado de extractos .....	80
<b>Anexo B.</b> Documentación de los Rf en la Columna Polar 2 .....	81
<b>Anexo C.</b> Documentación de los Rf en la Columna Apolar 4 .....	83
<b>Anexo D.</b> Documentación de los Rf en la Columna Polar 5 con carga de columna del 2,5% .....	84
<b>Anexo E.</b> Documentación de los Rf en la Columna Polar 6 con carga de columna del 2,5% .....	86
<b>Anexo F.</b> Documentación de los Rf en la Columna Polar 8 con carga de columna del 5% .....	87



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> <i>Desmodium adscendens</i> .....	15
<b>Figura 1.2</b> Origen de los principales metabolitos secundarios en relación a las vías metabólicas básicas.....	17
<b>Figura 1.3</b> Estructura básica de los Flavonoides.....	20
<b>Figura 1.4</b> Flavonoides: Estructuras químicas.....	20
<b>Figura 1.5</b> Estructura de un lignano simple.....	21
<b>Figura 1.6</b> Taninos Condensados.....	21
<b>Figura 1.7</b> Taninos Hidrolizables.....	22
<b>Figura 1.8</b> Estructura básica para Cumarinas.....	22
<b>Figura 1.9</b> Cromatografía de Capa Fina.....	25
<b>Figura 1.10</b> Miscibilidad de solventes orgánicos en agua.....	28
<b>Figura 1.11</b> Cromatografía de Columna.....	29
<b>Figura 2.1</b> Recolección en Jadan-Gualaceo.....	34
<b>Figura 2.2</b> Método de Percolación.....	36
<b>Figura 2.3</b> Cálculo de DER <sub>NATIVO</sub> .....	37
<b>Figura 2.4</b> Método de Desengrasado.....	37
<b>Figura 3.1</b> Agotamiento de metabolitos activos.....	45
<b>Figura 3.2</b> Determinación de Alcaloides en la fase móvil AE-METOH-Agua (100:13,5:10).....	48
<b>Figura 3.3</b> Determinación de Flavonoides.....	49
<b>Figura 3.4</b> Determinación de Flavonoides.....	49
<b>Figura 3.5</b> Determinación de Flavonoides.....	50
<b>Figura 3.6</b> Determinación de Flavonoides.....	50
<b>Figura 3.7</b> Saponinas, placa eluida en la fase móvil: Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10).....	50
<b>Figura 3.8</b> Cumarinas, placa eluida en la fase móvil: AE-METOH-Agua (100:13,5:10).....	51
<b>Figura 3.9</b> Cumarinas, placa eluida en la fase móvil Tolueno-AE (93:7).....	51
<b>Figura 3.10</b> Terpenos, placa eluida en la fase móvil Tolueno-AE (85:15).....	52
<b>Figura 3.11</b> Elución de compuestos con Hexano 100%.....	53
<b>Figura 3.12</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 1 a la 16.....	54
<b>Figura 3.13</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 17 a la 32.....	54
<b>Figura 3.14</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 33 a la 48.....	56
<b>Figura 3.15</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 49 a la 64.....	56
<b>Figura 3.16</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 65 a la 80.....	57
<b>Figura 3.17</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 81 a la 96.....	57
<b>Figura 3.18</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 97 a la 112.....	58
<b>Figura 3.19</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 113 a la 128.....	58
<b>Figura 3.20</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 129 a la 144.....	60
<b>Figura 3.21</b> Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 145 a la 154.....	60
<b>Figura 3.22</b> Elución de las Fracciones 33 a la 64 de la Columna Polar 7 con carga de columna del 5%.....	68
<b>Figura 3.23</b> Elución de las Fracciones 65 a la 96 de la Columna Polar 7 con carga de columna del 5%.....	68
<b>Figura 3.24</b> Elución de las Fracciones 97 a la 112 de la Columna Polar 7 con carga de columna del 5%.....	69
<b>Figura 3.25</b> Elución de las fracciones unidas en la Columna Polar 1.....	72
<b>Figura 3.26</b> Detección de la actividad antioxidante con DPPH como revelador en la Columna 1 del F1 al F10.....	74
<b>Figura 3.27</b> Detección de la actividad antioxidante con DPPH como revelador en la Columna 1 del F11 al F17.....	74



## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
Å	Angstroms
Ác.	Ácido
AE	Acetato de Etilo
C	Carbono
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
ETOH	Etanol
G	Gramos
IPP	Isopentenil Pirofosfato
METOH	Metanol
Mg	Miligramos
ml	Mililitros
Nm	Nanómetros
R <sub>f</sub>	Factor de Retención
SNC	Sistema Nervioso Central
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografía de Capa Fina)
UV	Ultravioleta
Vol	Volumen
μl	Microlitros
°C	Grados centígrados





*Fenanda Tatiana Zamora Amores*, autora del Trabajo de Titulación “Estandarización de la metodología de cromatografía de columna para el aislamiento de metabolitos activos a partir de extractos vegetales”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 4 de Junio de 2017

Fernanda Tatiana Zamora Amores

C.I: 0106604333



Universidad de Cuenca

Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

---

*Fernanda Tatiana Zamora Amores* en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Estandarización de la metodología de cromatografía de columna para el aislamiento de metabolitos activos a partir de extractos vegetales”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 4 de junio de 2017

Fernanda Tatiana Zamora Amores

C.I: 0106604333



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por regalarme la oportunidad de culminar mi vida universitaria, a mi familia y mi esposo por toda su comprensión y apoyo durante este proceso.

De manera especial, mis agradecimientos, al Dr. Fabián León, Dra. Nancy Cuzco y Bqf. Diana Morales, por toda la dedicación, comprensión y ayuda brindada a lo largo de esta investigación, por compartir de manera desinteresada todo su conocimiento, sin ustedes este éxito no fuera posible.

A todos quienes conforman el Proyecto VLIR, Bqf. Jessica Calle, Bqf. Andrea Abril y Dra. Eugenia Peñaherrera, Dra. Isabel Wilches por sus palabras de aliento y preocupación.



## DEDICATORIA

Quiero dedicar todo el esfuerzo realizado a lo largo de estos años a las más personas más importantes en mi vida, quienes de forma indirecta participaron en la culminación de mi carrera profesional.

Especialmente a mi querido esposo, Pedro, por ser mi amigo y confidente, sobre todo por caminar a mi lado todos estos años llenándome de alegrías en los momentos más difíciles.

A mi mami, Silvia, por su amor infinito, por aceptarme con mis virtudes y defectos, por todo el trabajo depositado en mí, este logro es suyo también, nunca me dejaste darme por vencida, me enseñaste a tener fe y creer que todo en la vida tiene su recompensa.

A mi papi, Fernando, por creer siempre en mí, enseñarme que el fracaso no era una opción, por más difícil que pareciera era capaz de conseguir lo que deseaba, gracias a ti aprendí a ser la mujer fuerte que soy hoy en día.

A mis hermanos, Santiago y Yessica, gracias por ser mis niños, por todos los lindos recuerdos de mi niñez, por siempre ser su consentida, por aguantar mi mal genio, los quiero mucho. Finalmente, a mi hermana menor Angélica, quien ha sido el motor que me impulsa todos los días, espero que veas en mí un ejemplo a seguir y que cumplas todas tus metas.

***Tatiana***



## INTRODUCCIÓN

En el Ecuador desde las primeras civilizaciones hasta la actualidad se ha observado el uso de plantas en el tratamiento de diferentes enfermedades, debido a sus propiedades medicinales por lo que muchos fármacos se investigan y se sintetizan a partir de estas. Motivo por el cual es estudio se basa en aislar los metabolitos activos del tipo antioxidantes de la especie *Desmodium adscendens*, los mismos que se han descrito en varios estudios su uso contra el asma bronquial, problemas gastrointestinales y hepáticos, debido a su poder antiinflamatorio otorgado por los compuestos fenólicos. **(Ansaloni, et al., 2010) (Acero, Millones, Ticona, & Torres, 2012)**

Los compuestos fenólicos, engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas, lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes, contrarrestando los daños producidos por los radicales libres, impidiendo así la producción de enzimas del tipo oxidasas causantes de la inflamación. **(Gimeno, 2004)**

Por todo lo expuesto anteriormente, surge la necesidad de disponer de un método de aislamiento y purificación de los extractos vegetales, el cual nos permita aislar cantidades considerables (mg) de metabolitos activos a comparación de otras técnicas como es el caso de la Cromatografía de Capa Fina y los cartuchos de silica comerciales, seleccionándose así al método de Cromatografía de Columna.

La aplicación de la metodología se basa en relacionar el comportamiento del extracto metanólico de la especie antes mencionada frente a las variables: fase móvil y carga de columna, permitiendo obtener una adecuada separación y resolución de los metabolitos activos para su posterior identificación y cuantificación, así mismo como la verificación de la actividad antioxidante mediante DPPH que sirvan de utilidad en futuras investigaciones de la actividad antiinflamatoria en animales de experimentación en el Proyecto Vllir.

La hipótesis planteada para este estudio fue:

Es factible lograr una estandarización o perfeccionamiento de la metodología de cromatografía de columna como solución viable para el aislamiento de elementos activos a partir de extractos del *Desmodium adscendens* en cantidades mayores (mg).



Se propusieron los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

- Validar una metodología de separación y purificación de metabolitos activos “antioxidantes” en extractos metanólicos de *Desmodium adscendens*.

### **Objetivos Específicos**

- Generar una metodología base en la determinación de la fase móvil mediante TLC.
- Traspasar la metodología a la cromatografía de columna.
- Evaluar el parámetro carga de la columna respecto al extracto.
- Cuantificar los analitos aislados.

## CAPÍTULO I

### 1 MARCO TEÓRICO

#### 1.1 *Desmodium adscendens*

##### 1.1.1 Taxonomía

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Fabales
<b>Familia</b>	Fabaceae
<b>Género</b>	Desmodium
<b>Especie</b>	<i>Desmodium adscendens</i>

**Tabla 1.1** Taxonomía de *Desmodium adscendens*  
(Universidad Nacional de Colombia, 2016)

##### 1.1.2 Descripción botánica

*Desmodium adscendens*, es una planta herbácea que mide de 10 a 50 cm de largo, es una planta rastrera, con tallos ramificados, sus hojas tienen posición alterna, formadas por tres hojuelas elípticas, siendo la central más grande que las laterales, las flores se disponen en grupos, son de color lila con pétalos desiguales entre sí, posee tallos fuertes que resisten al pisoteo. (Freitas, 2012)



**Figura 1.1** *Desmodium adscendens*  
(Freitas, 2012)



### 1.1.3 Hábitat y Distribución

*Desmodium adscendens* es una especie que se propaga fácilmente en el pasto común, se encuentran en potreros, a orillas de ríos, pantanos y bosques, crecen en suelos húmedos, pero no en exceso y florecen durante todo el año. (Garcia)

Se la puede encontrar en los campos no cultivados de los Andes del Ecuador, en donde es conocida como Hierba del Infante ya que algunas parturientas de bajos recursos suelen tomar en infusión debido a sus propiedades antiinflamatorias, además es una especie con amplia distribución geográfica en África, Asia y América. (Astudillo, 2003)

## 1.2 METABOLISMO VEGETAL

El metabolismo vegetal es el conjunto de reacciones químicas enzimáticamente catalizadas en la célula vegetal, dichas reacciones pueden o no intervenir en el proceso de desarrollo de las plantas y se clasifican en:

- Metabolitos Primarios
- Metabolitos Secundarios

### 1.2.1 Metabolitos Primarios

Pueden ser encontrados en todas las plantas, son de vital importancia para el crecimiento y reproducción de las mismas, cumplen con procesos químicos como la fotosíntesis, respiración vegetal, transporte de solutos y son capaces de sintetizar azúcares, aminoácidos, nucleótidos y lípidos. (Mosquera, 2014)

### 1.2.2 Metabolitos Secundarios

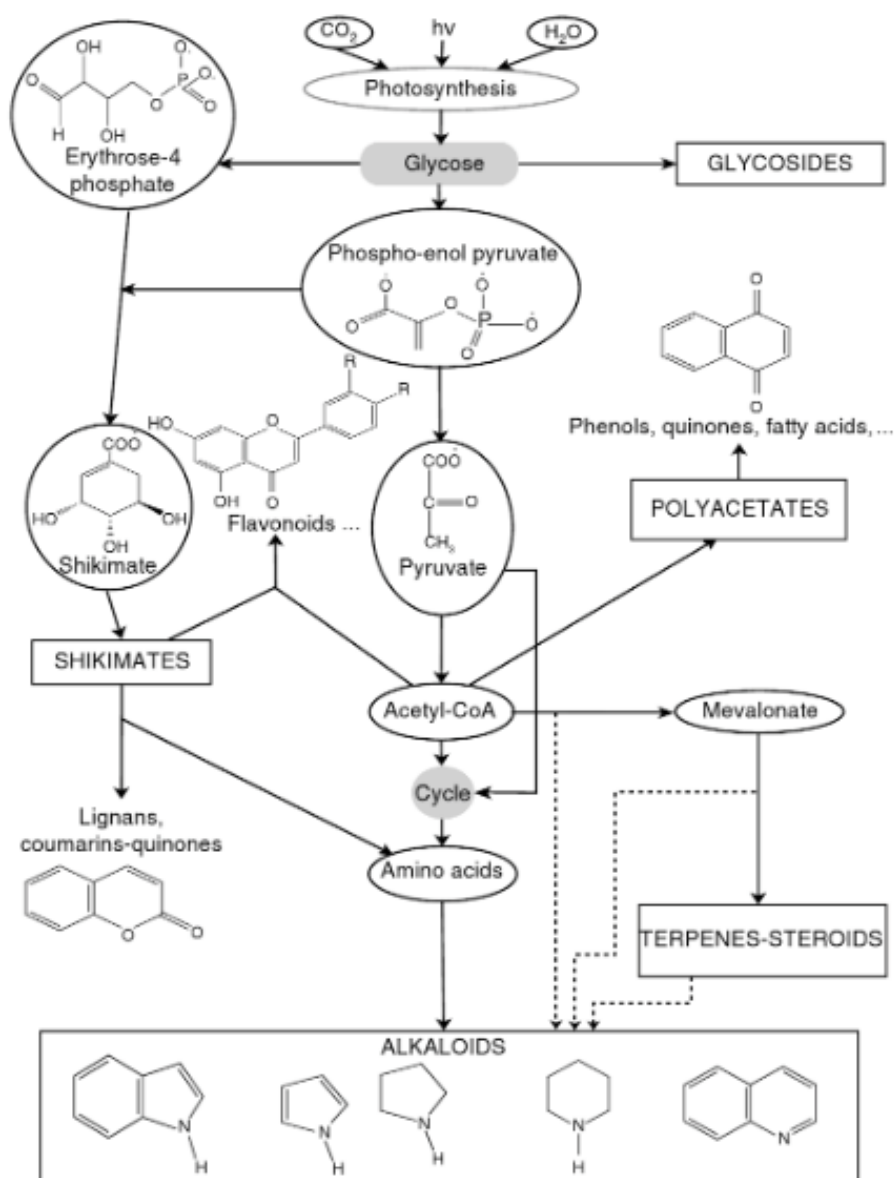
Se encuentran almacenados en el interior de la vacuola, por lo que su extracción y purificación es más dificultosa que el de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios no son necesarios para el crecimiento ni reproducción de las plantas, pero cumple roles muy importantes en el reino vegetal.

Cada familia de las plantas, género o especie produce una característica química que puede ser usado como característica taxonómica en la clasificación de las plantas.

Los metabolitos secundarios son: Terpenos, compuestos fenólicos y sus derivados, compuestos nitrogenados o alcaloides. (Ioanna, 2008)



El origen de las principales categorías de metabolitos secundarios en relación con las vías metabólicas básicas se puede demostrar en la **Figura 1.2**.



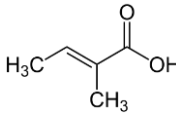
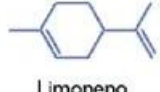
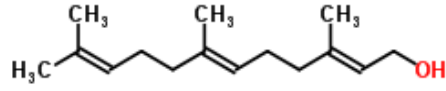
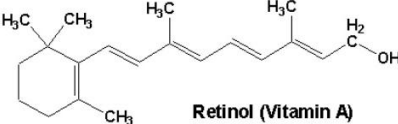
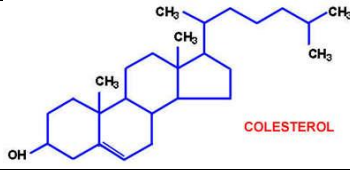
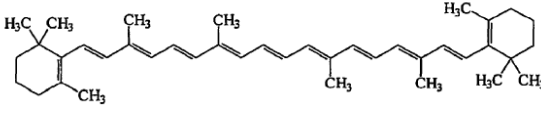
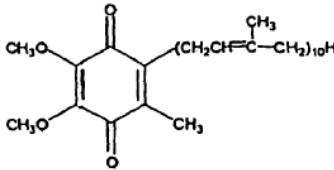
**Figura 1.2** Origen de los principales metabolitos secundarios en relación a las vías metabólicas básicas (Ioanna, 2008)

### 1.3 TERPENOS

Los Terpenos son lípidos no saponificables que forman parte de los aceites esenciales de algunas plantas y flores, son sintetizados a partir de un precursor fundamental el IPP (Isopentenil Pirofosfato) y mediante dos rutas metabólicas, la primera es la ruta del ácido mevalónico, y la segunda es la ruta del fosfato de metileritritol. (Taiz & Zeiger, 2006)

### 1.3.1 Clasificación

Los terpenos se encuentran formados por repeticiones de una molécula de cinco átomos de carbono llamado isopreno, por lo que se clasifican según el número de unidades de isopreno presentes en el compuesto en:

Clase	Principales compuestos químicos	Ejemplo
<b>Hemiterpenos</b> (1 unidad de Isopreno)	Ácido tíglico, ácido Isoamilo	
<b>Monoterpenos</b> (2 unidades de Isopreno)	Geraniol, limoneno y alcanfor	 Limoneno
<b>Sesquiterpenos</b> (3 unidades de Isopreno)	Cedrol, azulenos y farnesol	
<b>Diterpenos</b> (4 unidades de Isopreno)	Vitamina A, ácido abiético y Giberílico	 Retinol (Vitamin A)
<b>Triterpenos</b> (6 unidades de Isopreno)	Escualeno, Lanosterol y colesterol	 COLESTEROL
<b>Tetraterpenos</b> (8 unidades de Isopreno)	Carotenoides	 Beta-caroteno
<b>Politerpenos</b> (más de 10 unidades de Isopreno)	Ubiquinona y plastoquinona	

**Tabla 1.2** Clasificación según su estructura de los principales tipos de terpenos (Facultad Química UNAM, 2013)

### 1.3.2 Funciones

Los Terpenos son los metabolitos que otorgan la coloración a los órganos vegetales, protegen a la planta de la sobre oxidación, atraen polinizadores y participan en la síntesis de las vitaminas A, K y E, entre ellos podemos nombrar algunos de vital importancia como: las giberelinas, las cuales son un grupo de hormonas vegetales que

controlan el crecimiento y desarrollo de tallos y frutos, estimulan la germinación de numerosas especies. Otros son los Hemiterpenos que protegen a la planta al repeler a los herbívoros atrayendo a depredadores y parásitos y el Farnesol, que ha demostrado su actividad quimiopreventiva contra el cáncer. (Nutrición Personalizada, 2010)

## 1.4 COMPUESTOS FENÓLICOS

Son compuestos aromáticos que tienen como estructura principal el fenol con sustituciones de hidroxilo, otros son compuestos polifenólicos más complejos clasificados por el número de átomos de carbono en el esqueleto básico y pueden tener uno o varias cadenas laterales, surgen de dos rutas principales: vía del ácido shikímico y la vía del acetato. (Gimeno, 2004)

- Vía del ácido shikímico da lugar a fenoles simples, ácidos fenólicos, lignanos y cumarinas y taninos.
- Vía del acetato: Dando lugar a policétidos, que proporcionan por ciclación a productos tales como xantonas y quininas.

### 1.4.1 Clasificación:

Los compuestos fenólicos se clasifican según el número de átomos de carbono en el esqueleto básico.

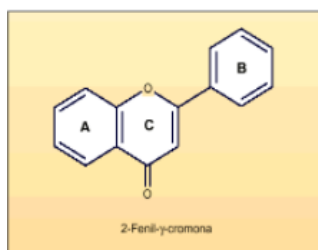
Esqueleto Básico de Cn	Clase
C <sub>6</sub>	Fenoles simples, benzoquinonas, quinonas
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos Fenólicos
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos Hidroxicinámico y cumarinas
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinona
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, Chalconas y Auronas
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanos
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoides
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> (C <sub>6</sub> ) (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos Condensados

*Tabla 1.3 Clases importantes de los compuestos fenólicos  
(Ioanna, 2008)*

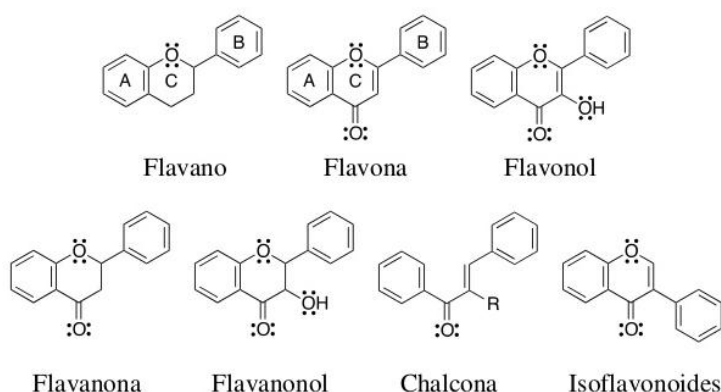
#### 1.4.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles cuyo término es referido para pigmentos de las plantas, estos poseen al menos dos subunidades fenólicas, las subdivisiones se basan principalmente en la ausencia o presencia de un sustituyente carbonilo en la posición C4, la presencia o ausencia de un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 y una sustitución de fenilo en las posiciones 2 o 3 del anillo de pirona. (Luengo, 2002)

En la naturaleza los flavonoides se encuentran de dos maneras; la mayoría está presente en forma de glucósidos (flavona, flavonol, flavanona, isoflavona, chalcona), debido a que se encuentran unidos a un azúcar y la aglicona que no posee un azúcar unido a su estructura, siendo la única excepción los flavonoles (catequinas y proantocianidinas). (Pila, 2015)



**Figura 1.3** Estructura básica de los Flavonoides  
(Pila, 2015)

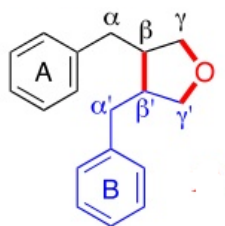


**Figura 1.4** Flavonoides: Estructuras químicas  
(Manzo, 2016)

#### 1.4.1.2 Lignanos

Los lignanos son compuestos naturales cuyo esqueleto resulta de la unión de los carbonos β de su cadena lateral a dos unidades derivadas del 1 fenil-propano,

presentan actividad antioxidante como es el caso del ácido nordihidroguayarético. Además, presentan actividad antifúngica, insecticida, alelopática y ciertas citoquinas. (Boluda, Duque, & Aragón, 2005)

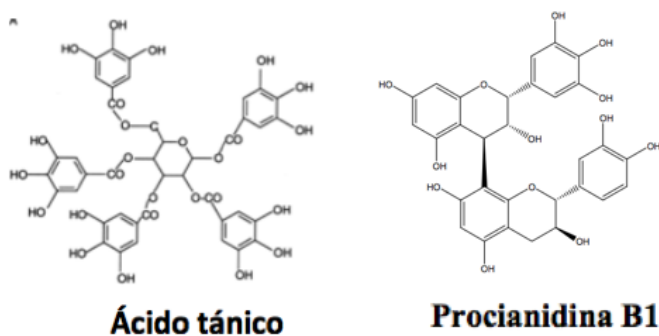


**Figura 1.5** Estructura de un lignano simple  
(Montealegre & Bayona, 2011)

#### 1.4.1.3 Taninos

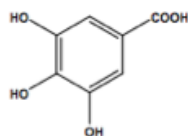
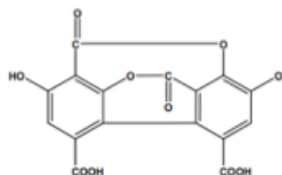
Los Taninos son compuestos solubles en agua, de un elevado peso molecular, característicos en las dicotiledóneas, son capaces de precipitar macromoléculas como las proteínas, celulosa y alcaloides debido a su poder astringente. Se clasifican en dos grupos, los taninos condensados y taninos hidrolizables. (Vázquez, Alvarez, López, Wall, & Rosa, 2012)

Los taninos condensados provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos flavonoides, son unidades de flavan-3-ol unidas entre sí por enlaces C-C en la posición 4-8 y 4-6, entre estos se encuentra el ácido tánico y la procianidina B1. (Fernández, 2007)



**Figura 1.6** Taninos Condensados  
(Girbes & Jiménez, 2013)

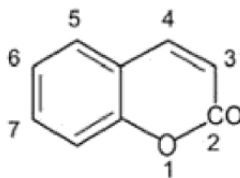
Los taninos hidrolizables en su estructura constan de poliésteres de un azúcar unido a un número variable de ácidos fenólicos, existiendo dos subdivisiones los gálicos y los elágicos. (Soto, 2013)

**Gálicos (ácido gálico)****Elágicos (ácido elágico)**

**Figura 1.7 Taninos Hidrolizables**  
(Girbes & Jiménez, 2013)

#### 1.4.1.4 Cumarinas

Las cumarinas son  $\alpha$ -pironas que se generan por lactonización del ácido o-cumárico, es casi característico de todas las cumarinas poseer un grupo hidroxilo en el C7. La umbeliferona o también conocida como la 7-hidroxycumarina puede ser considerada como el precursor de las cumarinas 6,7-di o 6,7,8-trihidroxiladas. Las cumarinas tienen propiedades vitamínicas, antiinflamatoria, antibacteriana, antiespasmódica e hipnóticas y aumentan la resistencia de las paredes capilares, se ha registrado el uso exitoso de psoralenos en varios desórdenes de la piel como eccemas y psoriasis. (Gonzales, 2015)



**Figura 1.8 Estructura básica para Cumarinas**  
(Gonzales, 2015)

#### 1.4.2 Funciones

Los compuestos fenólicos actúan como fitoalexinas, es decir que las plantas rotas o heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos, contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta por ejemplo; las antocianinas son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas, cuando los fenoles se oxidan dan lugar a las quinonas siendo las responsables del color pardo indeseable de la oxidación. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan el sabor característico de la cebolla, el cacao, el aceite de oliva virgen. (Gimeno, 2004)

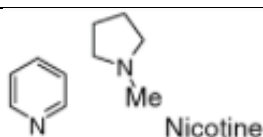
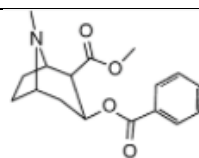
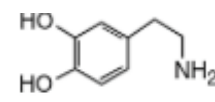
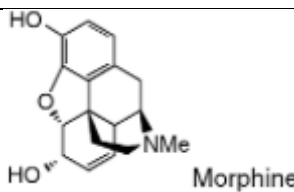
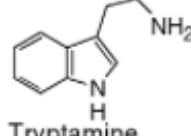
## 1.5 COMPUESTOS NITROGENADOS

Los compuestos nitrogenados o también conocidos como alcaloides son un grupo de sistemas heterocíclicos nitrogenados derivados de aminoácidos y triterpenos, con una actividad farmacológica predominante psicoactiva, por lo que es usada para tratamientos psicológicos y para aliviar el dolor.

El nitrógeno puede estar presente como una amina primaria, secundaria, terciaria, sal cuaternaria de amonio, amida y N-óxidos. (Ioanna, 2008)

### 1.5.1 Clasificación

Se clasifican en cinco grupos de acuerdo al aminoácido o derivados de los cuales son biosintetizados:

Clase	Principales compuestos químicos	Ejemplo
Piridina	Piperina, pilocarpina, nicotina, etc.	 Nicotine
Tropina	Atropina, cocaína.	 Cocaine
Quinolina	Quinina, alcaloides de brucina y dopamina	 Dopamine
Isoquinolina	Los alcaloides del opio: morfina, codeína, tebaína, papaverina	 Morphine
Indol-alcaloides	Serotonina, reserpina, triptamina.	 Tryptamine

**Tabla 1.4** Clasificación según la estructura de los compuestos nitrogenados (Ioanna, 2008)

### 1.5.2 Funciones

Los alcaloides cumplen diversas funciones en las plantas, uno de los más importantes son sus propiedades alucinógenas, según la dosis y la duración del tratamiento pueden



ser analgésicos, anestésicos, psicotrópicos, generalmente actúan sobre el sistema nervioso central como: la cafeína o la cocaína que tienen acción estimulante y la morfina con efectos depresores del SNC. (EcuRed, 2017)

## 1.6 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla, mediante un sistema bifásico, el que consiste en una fase estacionaria que retiene los compuestos a separar y una fase móvil que desplaza de manera diferencial los compuestos a través de la fase estacionaria. (Méndez, 2011)

La cromatografía se puede clasificar de diferentes maneras:

- **Dependiendo de la naturaleza de las fases:** (Burriel Martí, Lucena Conde, Arribas Jimeno, & Hernández Méndez, 2008)
  - Cromatografía sólido-líquido: La fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido
  - Cromatografía líquido-líquido: Ambas fases son líquidos y en la estacionaria el líquido se ancla a un soporte sólido.
  - Cromatografía líquido-gas: La fase estacionaria es un líquido no volátil sobre soporte sólido y la fase móvil un gas.
  - Cromatografía sólido-gas: La fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.
- **Atendiendo al proceso químico-físico que va a protagonizar el proceso de separación:** (Burriel Martí, Lucena Conde, Arribas Jimeno, & Hernández Méndez, 2008)
  - Cromatografía de adsorción: Se producen interacciones de tipo polar siendo la fase estacionaria un sólido.
  - Cromatografía de partición: La separación se basa en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla entre las dos fases siendo ambas líquidas. Cuando la estacionaria es menos polar que la móvil se denomina cromatografía de fase inversa.
  - Cromatografía de intercambio iónico: Se producen intercambios entre iones presentes en la fase estacionaria y los del compuesto orgánico solubilizado e ionizado en la fase móvil.

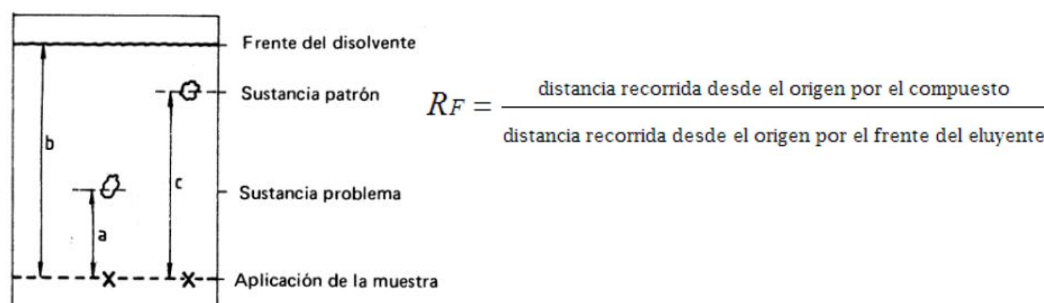


- **Con base en la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria:** (Burriel Martí, Lucena Conde, Arribas Jimeno, & Hernández Méndez, 2008)
  - Cromatografía plana: El soporte es una placa de vidrio o de plástico: Cromatografía en papel y Cromatografía en capa fina (TLC)
  - Cromatografía en columna: Utiliza como soporte una columna de vidrio.

## 1.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, que permite determinar la identificación de compuestos de una mezcla mediante la formación del cromatograma, además comparar diferentes muestras entre sí. Las muestras a analizar se depositan en forma de banda cerca de un extremo de una lámina de plástico, aluminio o vidrio recubierta de una capa fina de adsorbente que en este caso se trata de la sílica gel (fase estacionaria), luego se coloca en una cámara cerrada para TLC la cual se ha dejado durante 15-30 minutos en contacto con la fase móvil para crear una atmósfera saturada del o la mezcla de solventes, estos van a ascender por capilaridad a través del adsorbente, produciéndose que las muestras recorran la placa, finalmente se usa un revelador que forma complejos coloreados que serán reconocidos por métodos espectrofotómetros y mediante el cálculo del  $R_f$  podremos determinar de qué sustancia se trata la muestra. (Velasco, 1992)

El factor de retención  $R_f$  es la distancia que cada compuesto se desplaza en la placa y a la vez es característico de los mismos. Cuando el desplazamiento del soluto es muy pequeño respecto al del solvente, se puede medir la distancia recorrida por el soluto frente a otra sustancia tomada como referencia (patrón). (Centro Universitario de los Lagos, 2014)



**Figura 1.9** Cromatografía de Capa Fina  
(Centro Universitario de los Lagos, 2014)

### 1.7.1 Fase estacionaria

En la cromatografía de fase normal, los adsorbentes forman fuertes interacciones moleculares en los sitios de adsorción polares con grupos funcionales polares de los compuestos, existen diversos tipos de fases estacionarias cuya adsorción aumentan de acuerdo a su polaridad: cianopropil <diol <aminopropilo << silicio = alúmina. (Waksmundzka, Sherma, & Kowalska, 2008)

La silica gel es el adsorbente más usado, los compuestos básicos son fuertemente retenidos por los grupos silanol y sirve para la detección de esteroides, aminoácidos, alcoholes, hidrocarburos, lípidos, aflatoxinas, bilis, ácidos, vitaminas y alcaloides. (UCDAVIS (University of California), 2017)

A su vez la retención de compuestos también depende de la polaridad de los grupos funcionales y aumentan en el siguiente orden: alcanos <alquenos <hidrocarburos aromáticos = cloroalcanos <sulfuros <éteres <cetonas = aldehídos = ésteres <alcoholes <amidas << fenoles, aminas y ácidos carboxílicos. La retención de la muestra se incrementa cuando la polaridad de la fase estacionaria aumenta y la polaridad de la fase móvil disminuye. (Waksmundzka, Sherma, & Kowalska, 2008)

### 1.7.2 Selección del solvente (fase móvil)

El estudio de cromatografía de capa fina permite elegir el solvente o la mezcla de solventes a usar para obtener la separación adecuada de los componentes de una muestra y es una referencia para la cromatografía de columna, la elección del solvente es un factor importante a tomar en cuenta ya que por medio de este se consigue que los componentes se muevan más rápido o más lento a través de la placa, ordenándose de menor a mayor polaridad. (Correa Cuevas, 2015)

Los solventes a ser usados como componentes en las fases móviles deben ser de pureza apropiada y de baja viscosidad, miscibles entre sí, uno de los parámetros fisicoquímicos que es de gran importancia es la fuerza de elución, se refiere a la capacidad del solvente o mezcla de solventes para eluir los solutos en la fase estacionaria, se conoce varios tipos de escalas para su caracterización entre ellas tenemos:

La escala de polaridad de Snyder es una de las más importantes en la clasificación de los solventes, utilizando el parámetro  $P'$  (índice de polaridad), mide la atracción intermolecular entre un soluto y un solvente, basándose en las medidas de solubilidad para la sustancia en cuestión en tres solventes: etanol (propiedades aceptoras de protones), dioxano (propiedades donador de protones) y nitrometano (describir las



propiedades dipolares del solvente), por lo tanto es una medida numérica de la polaridad relativa de varios solventes. (Waksmundzka, Sherma, & Kowalska, 2008)

Otra escala de vital importancia es la serie eluotrópica, la cual estima la resistencia de un solvente por su efecto sobre la retención de soluto, para generar valores distintos para cada solvente, se obtuvo el tiempo medio de retención a partir de un gran número de solutos sobre un material de soporte específico representado con la letra  $\varepsilon^\circ$  acompañado del nombre del soporte (adsorbente) usado. (Sadek, 2002)

SERIE ELUOTRÓPICA DE LOS SOLVENTES		
Solvente	$\varepsilon^\circ$ (SiO <sub>2</sub> )	P'
Pentano	$\equiv 0.00$	0.0
Hexano	0.00-0.01	0.1
Iso-octano	0.01	0.1
Ciclohexano	0.03	0.2
tetracloruro de carbono	0.11	1.6
1 – Clorobutano	0.20	1.0
Xileno	-	2.5
Tolueno	0.22	2.4
Clorobenceno	0.23	2.7
Benceno	0.25	-
Etil éter	0.38-0.43	2.8
Diclorometano	0.30-0.32	3.1
Cloroformo	0.26	4.1
1,2-Dicloroetano	-	3.5
Metil etil cetona	-	5.7
Acetona	0.47-0.53	5.1
Dioxano	0.49-0.51	4.8
1-Pentanol	-	-
Tetrahidrofurano	0.53	4.0
Metil t-butil éter	0.48	2.5
Acetato de etilo	0.38-0.48	4.4
Dimetilsulfóxido	-	7.2
Dietilamino	-	-
Acetonitrilo	0.50-0.52	5.8
1-Butanol	-	3.9
Piridina	-	5.3
2 – Metoxietanol	-	5.5
Alcohol n-propílico	-	4.0
Alcohol isopropílico	0.60	3.9
Etanol	-	-
Metanol	0.70-0.73	5.1
Etilenglicol	-	-
Dimetil formamida	-	6.4
Agua	-	10.2

**Tabla 1.5** Fuerza eluotrópica de Solventes  
(Sadek, 2002)

Los ácidos, bases y compuestos fuertemente polares pueden producir rayas en lugar de manchas en solventes neutros, dificultando calcular el  $R_f$  y pueden obstruir otras manchas. La adición de un pequeño porcentaje de ácido acético o fórmico al solvente puede corregir la formación de rayas con ácidos, ya que mejoran la ionización. De forma similar para las bases, la adición de un poco de trietilamina puede mejorar los resultados. Para los compuestos polares agregar un porcentaje de metanol por lo menos también puede mejorar los resultados. (UCDAVIS (University of California), 2017)

### 1.7.3 Miscibilidad

La miscibilidad entre los solventes es otro parámetro a tener en cuenta ya que se debe conseguir una mezcla homogénea sin separación de las fases, en los compuestos orgánicos la miscibilidad del compuesto con agua depende del porcentaje del peso de la cadena de hidrocarburos. En los alcoholes, el etanol que tiene dos átomos de carbono es miscible en agua, mientras que el 1-Octanol es inmiscible, en algunos casos la miscibilidad de los líquidos depende de la proporción en la que se encuentra en la mezcla, como es el caso del éter etílico que es miscible en agua solo en una cierta medida. El acetato de etilo en presencia del agua se descompone en ácido acético y etanol. (Ñúñez, 2008)

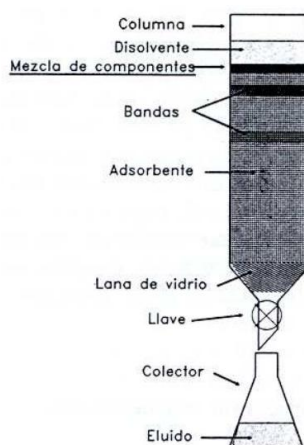
	solvente	Densidad (g/ml)	Solubilidad en agua (g/100ml)	Agua disuelta (g/100ml)
solventes inmiscibles en agua	Acetato de etilo	0.900	8.0	2.9
	Benceno	0.879	0.5	0.06
	Ciclohexano	0.779	0.001	0.01
	Cloroformo	1.492	0.5	0.07
	Diclorometano	1.325	2.0	1.3
	Éter dietílico	0.715	6.0	1.5
	Hexano	0.659	0.001	0.01
	Pentano	0.626	0.036	0.01
	Tetracloruro de carbono	1.594	0.025	0.01
solventes miscibles en agua	Acetona, Acetonitrilo, Ácido acético, Ácido fórmico, <i>t</i> -Butanol, Dimetilformamida (DMF), Dimetilsulfóxido (DMSO), Dimetoxietano (DME), 1,4-Dioxano, Etanol, Hexametilfosforamida, (HMPA), Metanol, Piridina, <i>i</i> -Propanol, <i>n</i> -Propanol Tetrahidrofurano (THF).			

**Figura 1.10** Miscibilidad de solventes orgánicos en agua  
(Rodas)

## 1.8 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La cromatografía en columna es una técnica de separación de mezclas o purificación de sustancias, que permite determinar en que fracción y en que cantidad se encuentra el compuesto deseado. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria puede ser sólida, la misma que se coloca en un recinto cilíndrico de vidrio en posición vertical provisto de una llave para regular el flujo de la fase móvil, se puede colocar en la parte inferior algodón o lana de vidrio, se forma una pasta entre la silica y el solvente dejando sedimentar la silica y se recoge el solvente sobrante, se coloca la muestra a separar y el o los solventes escogidos. (Valcárcel Cases & Gómez Hens, 1998)

Al descender la fase móvil por la columna produce el desarrollo del cromatograma apareciendo zonas o bandas horizontales bien definidas que corresponden a cada uno de los compuestos de la mezcla, el eluido se debe recoger en fracciones y se realiza un estudio por TLC de cada una. Las fracciones menos polares serán las primeras en salir debido a que se retienen por un menor tiempo en el adsorbente, por lo contrario, las sustancias más polares son retenidas durante un mayor tiempo en el adsorbente. (Furuken, 2006)



**Figura 1.11** Cromatografía de Columna  
(Castillo, 2011)

### 1.8.1 Factores necesarios en la Cromatografía de Columna

Para la cromatografía de columna el adsorbente debe cumplir con algunos factores como:

- La Silica gel para cromatografía de columna, se realiza a base de dióxido de silicio de alta pureza, de aspecto granuloso y tamaño homogéneo, cuyo pH varía en un rango de 2 a 7.5, posee un gran poder adsorbente y tiene un tamaño de partícula de 15-100 micras, su densidad aparente: 0,40- 0,65 gm / ml y con un diámetro de poro: 20,60,100,300,1000 Å. Es un producto que se puede

regenerar si se somete a una temperatura de entre 120-180 °C desprendiendo la humedad que haya absorbido por lo que puede reutilizarse varias veces sin que afecte la capacidad de absorción. (GRUPO HAIYANG YINHAI ESPAÑA, S.L.)

- La selección de la fase móvil es de vital importancia ya que una fase móvil muy polar lavará todos los componentes sin ninguna separación y una fase móvil muy apolar dará lugar a una separación de banda ancha pobre, por lo que la cromatografía de columna se debe iniciar con un solvente muy no polar para que se forme la primera banda y eluya analitos no polares, seguida de una mezcla de solventes con una polaridad media que permitirá que se formen varias bandas y que eluyan analitos polares y finalmente se aumenta la polaridad de los solventes en la fase móvil que permita un elución completa de los analitos. (Shini, 2015)
- El tiempo de retención, es aquel tiempo que tarda cada sustancia en abandonar la columna, la retención se encuentra en función de las características moleculares de cada compuesto, del adsorbente, del solvente y del diámetro de la columna. (F. Striegel & Hill, 1996)
- Cuando la velocidad de flujo es más lenta produce la formación de bandas más estrechas, por lo que la velocidad adecuada en la Cromatografía de columna es de 20 gotas por minuto a flujo continuo de la fase móvil durante todo el experimento para una mejor separación de las fracciones. (Shini, 2015)
- La resolución cromatográfica constituye una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos o más analitos, cuanto mayor sea la resolución mejor separadas se encontrarán las bandas y así mismo aumenta el número de estas. (Correa Cueva, 2015)

## 1.9 RADICALES LIBRES

Los radicales libres son aquellas especies químicas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, siendo los responsables de la oxidación biológica. Las moléculas incompletas atacan agresivamente a otras moléculas para poder remplazar sus electrones faltantes, de esta manera los radicales libres roban los electrones de la proteína en el cuerpo, lo que daña el ADN y otras estructuras celulares, por lo que, si el cuerpo no obtiene la protección adecuada, los radicales libres se salen de control ocasionando el mal desempeño de las células y causando



enfermedades como: cáncer, parkinson, alzheimer, cataratas, aterosclerosis. (Venereo, 2002)

Los radicales libres son un tipo de metabolitos reactivos que son producidos naturalmente en el cuerpo como respuesta biológica natural a las toxinas ambientales como: el humo del cigarro, la luz solar, los químicos, la radiación y el ejercicio extenuante. (Mercola, 2015)

### **1.10 ANTIOXIDANTES**

Los antioxidantes son una clase de moléculas capaces de inhibir o retardar la oxidación mediante la donación de electrones, estos juegan un papel importante en la salud al neutralizar los efectos dañinos de los radicales libres, pueden ser de origen endógeno y exógeno. (Coronado, Vega, Gutiérrez, Vázquez, & Radilla, 2015)

Los antioxidantes endógenos son las enzimas sintetizadas por el propio organismo, entre estas encontramos al surperóxido dismutasa y al glutatión peroxidasa, por otra parte, los antioxidantes exógenos son aquellos provenientes de fuentes externas, necesitándose la ingesta continua de los nutrientes que los contienen, entre estos tenemos a la vitamina A, E y C, los  $\beta$ -carotenos, luteína, flavonoides, licopenos, el ácido lipoico y los cofactores (cobre, zinc manganeso, hierro y selenio). (Criollo & Molina)

La actividad antioxidante, antibacteriana, anticancerígena y antiinflamatoria, de los flavonoides resulta de la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, la ciclooxygenasa y fosfolipasa A, evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO). (Venereo, 2002)

### **1.11 DPPH**

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo es un compuesto orgánico comúnmente conocido como DPPH, es un polvo cristalino de color violeta intenso compuesto por moléculas estables de radicales libres, que sirve para medir o visualizar la capacidad antioxidante de alimentos y compuestos sintéticos, al poner en contacto el DPPH con la muestra a analizar, su coloración característica se torna a blanco amarillento. (Guija, Inocente, Ponce, & Zarzosa, 2015) (Gu, Wu, & Wang, 2009)



## CAPÍTULO II

### 2 MATERIALES Y MÉTODOS

El tipo de investigación del estudio fue descriptiva, en el cual se observó el efecto que se presentó en la columna de cromatografía al aplicar las variables dependientes como la polaridad del solvente y la carga de columna e independientes como el Factor R<sub>f</sub> y el rendimiento.

#### 2.1 LOCALIZACIÓN

Las actividades prácticas y experimentales de este estudio se llevaron a cabo en los laboratorios del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad de Cuenca.

#### 2.2 MATERIALES

En este trabajo de investigación se requirió de los siguientes materiales:

##### 2.2.1 Materia prima

Se trabajó con las hojas del *Desmodium adscendens* denominada comúnmente como “Hierba del Infante” utilizando esta especie vegetal para el aislamiento y purificación de metabolitos activos, a través de la metodología de cromatografía de columna y la detección de actividad antioxidante por DPPH.

##### 2.2.2 Materiales, Solventes y Reactivos

Se necesitó de: tijeras podadoras, bolsas de papel, papel blanco, papel filtro, papel aluminio, cinta adhesiva, marcadores, recipientes plásticos, cernidor, bandejas de acero, soporte de hierro, pinzas, nueces, frascos de vidrio, botellas de vidrio de 120ml, tubos de ensayo 20ml, algodón, bolitas de vidrio, balones de fondo redondo, adaptadores, pipeta pasteur, tubos de liofilizar, tapones de caucho, embudos de separación, vasos de precipitación, cámara de TLC, placas de vidrio de TLC 20x20 cm, columna cromatográfica de vidrio, lana de vidrio y viales ambar.

A continuación, se detalla la mezcla de solventes usados en las diferentes fases móviles:

- Acetato de Etilo-Hexano (50:50)
- Acetato de Etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10)
- Acetato de Etilo-Ácido Fórmico-Ácido Acético Glacial-Agua (100:11:11:26)





- Acetato de Etilo- Ácido Fórmico-Ácido Acético-Metanol-Agua (30:10:1: 50:10)
- Acetato de Etilo- Ácido Fórmico-Ácido Acético-Metanol-Agua (80:5:1: 10:10)
- Acetato de Etilo-Ácido Fórmico-Ácido Acético Glacial-Agua (100:11:11:26)
- Cloroformo-hexano (50:50)
- Cloroformo-Acetona-Ácido Fórmico (75:16,5:8,5)
- Cloroformo- Etanol- Agua- Ácido Fórmico-Ácido Acético (5:70:14: 5:1)
- Cloroformo- Etanol- Agua- Ácido Fórmico-Ácido Acético (51:34:9: 5:1)
- Hexano (100%)
- Tolueno-Acetato de Etilo (85:15)
- Tolueno-Acetato de Etilo (93:7)
- Tolueno-Dioxano-Ácido Acético (90:25:4)

En la elaboración de los reveladores usados en las placas de TLC, se requirió de los siguientes reactivos:

- Dragendorff: Se usó una mezcla 1:1 de la solución (a) + (b).  
Solución (a): Se disolvió 0,85 g de nitrato básico de bismuto en 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua, fue necesario filtrar.  
Solución (b): Se disolvió 8 g de yoduro de potasio en 30 ml de agua.
- Productos Naturales: Se necesitó de dos reactivos, los mismos que se usaron en diferentes bandejas vidrio, uno después del otro.  
En la bandeja 1, se depositó 1% de Difenilboriloxietilamina metanólico (NP) y en la bandeja 2 el 5% de polietilenglicol-4000 etanólico.
- Hidróxido de Potasio: 10% de Hidróxido de potasio etanólico.
- Anisaldehído ácido sulfúrico: 0,5 ml de Anisaldehído mezclados con 10 ml de ácido acético glacial, seguido por 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- DPPH: 2.54 mM de 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo metanólico.

### 2.2.3 EQUIPOS

- Balanza analítica Mettler Toledo, serie N° 1129070512, Suiza, 2007.
- Balanza analítica Boeco BBL - 31, serie N° 19509555, Alemania, 2007.

- Baño María con sonicador Memmert, serie L315.0629, Alemania, 2016.
- Estufa VWR, serie N° 01053410, USA, 2009.
- Equipo de fotodocumentación Camag TLC Visualizer, serie N° 200239, Suiza, 2013.
- Cabina de extracción de gases Quimis, serie N° 07111126, Brasil, 2005.
- Biofreezer Fisher Scientific, serie N° 0145903101140804, USA, 2014
- Centrífuga sigma 2-6, serie N° 120303, Alemania, 2007.
- Rotavapor Heildolph, Laborota 4000 efficient, serie N° 04819293, Alemania, 2006.
- Congelador dairei freezeer -45/-85°C ULTF80, USA, 2009.
- Destilador de agua Fanem, modelo 724, serie TAD – 30979, Brasil, 2005.
- Horno Pro-3 TC-96N, Ecuador, 2007.

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1 RECOLECCIÓN, LAVADO Y SECADO

La especie utilizada para el trabajo de investigación fue el *Desmodium adscendens* recolectada en la parroquia de Jadan, cantón Gualaceo, a una altura aproximada de 2800m sobre el nivel del mar, tras identificarla por las características botánicas descritas en el **apartado 1.1.2** y con la ayuda de unas tijeras de podar se procedió a recolectar la planta sin arrancarla del suelo para que se pueda regenerar. Se colocó y transportó en bolsas de papel para conservar y proteger de la luz, las mismas que fueron etiquetadas con el nombre científico, nombre común, fecha, hora, lugar de recolección y nombre del operador.



**Figura 2.1** Recolección en Jadan-Gualaceo



Inmediatamente, se procedió al lavado, para lo cual se seleccionó únicamente las hojas del *Desmodium adscendens*, libres de contaminación con materia orgánica, inorgánica e insectos y se lavó con agua potable hasta eliminar cualquier residuo de tierra, posteriormente se sumergió durante 10 minutos en agua destilada para eliminar metales. Finalmente, se escurrió y se retiró el exceso de agua sobre bandejas de acero inoxidable cubiertas con papel blanco.

La desecación de la droga se realizó mediante dos procedimientos: El primero fue el secado en horno, en donde se colocó a la droga fresca en bandejas de acero inoxidable a una temperatura de 40 °C en el horno Pro 3 durante 12 horas, transcurrido el tiempo, se pesó la droga seca y se almacenó en bolsas de papel correctamente rotuladas. El segundo procedimiento de desecación de la droga fue el secado por liofilización, en el cual se cortó la droga fresca en pequeños trozos, luego de haber pesado el tubo liofilizador, se introdujo la droga sin que supere los 4 gramos por tubo, se congeló por un mínimo de 2 horas a -82 °C, para finalmente insertar el corcho y el adaptador al liofilizador al vacío durante 24 horas a una temperatura -0,51 °C y a 0,071 bar.

### 2.3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS

La preparación de extractos metanólicos es un proceso que consta de cinco etapas: Percolación, concentración del extracto, eliminación del solvente, liofilización y envasado.

#### 2.3.2.1 Percolación

Una vez triturada la droga seca en una licuadora, se humectó con 15 ml de metanol por cada 12 gr de droga seca entre 12-15 horas. Se procedió a armar el percolador (**Figura 2.2**), se introdujo el algodón al fondo del frasco de vidrio, sobre este se colocó la droga humectada y encima de esta, el papel filtro y bolitas de vidrio cubriéndolas de metanol, dejando en reposo durante 24 horas y con papel aluminio se protegió de la luz solar. Luego de transcurrido el tiempo, constantemente se vertió metanol sobre la altura de las bolitas de vidrio, manteniendo siempre la droga humectada y en tubos de vidrio etiquetados se recogió el 75% del peso total de la droga a 20 gotas por minuto, siendo este volumen la Fracción 1.

Se continuó percolando para obtener la Fracción 2 en un balón de aforo de fondo redondo hasta llegar a reacción negativa, por TLC.



**Figura 2.2** Método de Percolación

### 2.3.2.2 Concentración de extractos y Liofilización

La concentración del extracto se realizó por destilación usando rotavapor a una temperatura no mayor a los 30 °C, la misma que continuó hasta sequedad total de la fracción 2 y se retiró el extracto seco del equipo. La redisolución se efectuó con la Fracción 1 y añadiendo pequeñas alícuotas de Metanol hasta redisolución total del extracto seco en el balón.

Para la eliminación del solvente usado (Metanol), se requirió de nitrógeno inerte, hasta obtener una cantidad aproximada de 3 ml de extracto y se procedió a preparar la muestra para liofilizar.

En los tubos para liofilización previamente pesados, se colocó los 3 ml de extracto, luego se agregó 20 ml de agua ultrapura a los tubos de vidrio para redissolver el extracto alrededor del mismo, utilizando baño María con sonicación. Una vez redissuelto, se transvaso al tubo para liofilización y se congeló a -82 °C, teniendo la precaución de que se forme una capa circular alrededor del tubo, por un mínimo de dos horas, para formar los núcleos de liofilización. Finalmente se colocó los tubos en el liofilizador a una temperatura de -51 °C y 0,070 bar durante 24 horas, luego se retiró los extractos secos, se pesó y se calculó el rendimiento del extracto, mediante el  $DER_{NATIVO}$  que se observa en la **Tabla 3.4**.

Para el cálculo de  $DER_{NATIVO}$  se utilizó la siguiente fórmula:

$$DER_{NATIVO} = \frac{\text{Droga vegetal inicial} \times 1}{\text{Extracto nativo}}$$

**Figura 2.3** Cálculo de  $DER_{NATIVO}$   
(Gaedcke, Frauke, Steinhoff, & Königswinter)

### 2.3.2.3 Envasado

Se depositó alícuotas de extracto exactamente pesados en viales ambar etiquetados y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso, cuyos pesos fueron registrados en el **Anexo A**.

### 2.3.3 DESENGRASADO DE EXTRACTO

El método de desengrasado de extractos fue empleado para eliminar el exceso de clorofila, para que no existiera interferencias en la visualización de las manchas cromatográficas en TLC, para esto se necesitó redissolver 1g de extracto seco en 48 ml de la mezcla Metanol-Agua (50:50). La solución fue vertida en el embudo de separación, duplicando el volumen con 96ml de n-Hexano, agitando vigorosamente durante 5 minutos, la fase superior fue descartada y se repitió dos veces el proceso con la mitad de n-Hexano. La fase acuosa fue concentrada en el rotavapor y mediante nitrógeno se eliminó el solvente, se liofilizó y se envasó el extracto seco sin clorofila en viales con un peso aproximado de 200 mg cada uno.



**Figura 2.4** Método de Desengrasado



## 2.3.4 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

### 2.3.4.1 Activación y rotulado de las placas de TLC

Cada placa de vidrio recubierta por la silica gel debió ser activada, colocándolas en la estufa a 100 °C por 12 horas, las mismas que en una superficie limpia y desinfectada, fueron rotuladas trazándose a 1 cm del borde inferior la línea de origen o siembra y la de frente a 8 cm de está para el recorrido de los metabolitos. Para el rotulado, en el borde inferior se colocó el nombre de los patrones y el código del extracto en estudio, en el borde superior izquierdo sobre la línea de frente se colocó la fase móvil usada y su concentración y al lado derecho superior se colocó el revelador y la fecha de realización.

### 2.3.4.2 Preparación y siembra de la muestra

Se preparó un extracto de concentración de 5 mg/ml en metanol, hasta redisolución total en baño María con sonicación. En la placa de TLC, en la línea de siembra se coloca 5µl de cada patrón y muestra a una distancia de 1 cm cada uno quedando patrón-muestra-patrón, dejando secar por un lapso de 5 minutos.

### 2.3.4.3 Preparación de la Fase Móvil

Se realizó la preparación de las diferentes fases móviles, para conocer la composición general del extracto, las mismas que fueron tomadas de la referencia bibliográfica que se detalla en la **Tabla 2.1**. Previó a proceder con la elución de los metabolitos, se colocó la fase móvil en la cámara, 20 minutos antes de la introducción de la placa de TLC.

### 2.3.4.4 Elución y revelado de las placas

Se colocó las placas de TLC al interior de la cámara de vidrio de manera vertical, quedando a 0,5 cm el borde inferior al contacto con la fase móvil y se cerró herméticamente para que esta ascienda a través de la placa hasta la línea de frente, en ese momento se retiró la placa y se dejó secar dentro de la cabina de extracción hasta evaporación total de la fase móvil. Posteriormente, se prosiguió a visualizar, identificar y tomar fotos de las placas en el equipo de fotodocumentación, con luz UV en las diferentes longitudes de onda, 254nm, 366nm y luz visible.

Para revelar las placas se seleccionó los reveladores específicos para cada metabolito investigado, los mismos que se encuentran descritos en la **Tabla 2.1**. Se colocó el



revelador en bandejas de vidrio y se introdujo las placas de TLC, cerciorándonos que queden cubiertas, inmediatamente se las sacó y se dejó secar en la cabina de extracción, luego del secado, nuevamente se usó el equipo de fotodocumentación para tomar y registrar las fotos usando las diferentes longitudes de onda.





Identificación y separación de Metabolitos Activos					
Extracto (5mg)	Metabolito a analizar	Patrón (0,5 mg)	Fase móvil	Revelador	Identificación
Metanólico	<b><u>Alcaloides</u></b>	-Cloruro de Berberine	AE-METOH-AGUA (100:13,5:10)	-Dragendorff	A 366nm: manchas de color: verde, café y tomate café.
	<b><u>Flavonoides</u></b>	- Quercetina -Quercetin-3-glucoronido.	AE-METOH-AGUA (100:13,5:10)	-Productos Naturales	A 366nm: FLAVONOLES: tomate, Amarillo, Amarillo-verdoso. FLAVONAS: tomate, Amarillo-verdoso.
			AE-Ác. Fórmico-Ác. Acético Glacial-Agua (100:11:11:26)		
			Cloroformo-Acetona-Ác. Fórmico (75:16,5:8,5)		
			Tolueno-Dioxano-Ác. Acético (90:25:4)		
	<b><u>Saponinas</u></b>	- Escina	AE-METOH-AGUA (100:13,5:10)	-Anisaldehído ácido sulfúrico	A luz visible: azul, azul violeta, amarillo marrón.
	<b><u>Cumarinas</u></b>	- Escopoletina - Umbeliferona	AE-METOH-AGUA (100:13,5:10)	-KOH 10% Etanol Absoluto	A 366nm: azul, azul verdoso, Amarillo marrón.
			Tolueno-AE (93:7)		
	<b><u>Terpenos</u></b>	- Eugenol - Geraniol	TOLUENO-AE (85:15)	-Anisaldehído ácido sulfúrico	A luz visible: azul, verde, rojo y café.

**Tabla 2.1** Identificación y Separación de metabolitos activos en el *Desmodium adscendens* (Wagner & Bladt, 1996)





## 2.3.5 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

### 2.3.5.1 Selección y relleno de la columna cromatográfica

Las columnas cromatográficas de vidrio seleccionadas tienen una altura de 35 cm y un diámetro de 0,30 cm, poseen una llave que permiten controlar el flujo de los solventes. En la parte inferior de cada columna se colocó 0,466g de lana de vidrio que sirve como filtro, para evitar que al momento que eluyan las fracciones fluya también la sílica. Para el relleno de la columna se utilizó sílica gel con un tamaño de partícula de 60 Angstroms, la misma que es disuelta formando una suspensión con 30 ml de Cloroformo en un vaso de precipitación, para luego ser vertida en la columna inmediatamente, se dejó en reposo las columnas usadas durante 24 horas para su compactación.

### 2.3.5.2 Tratamiento de la muestra

Se utilizó 8 alícuotas del extracto desengrasado de *Desmodium adscendens*, las cuales se disolvieron en una mezcla de Cloroformo-Metanol-Agua (45:45:10), cada extracto disuelto se colocó dentro de la columna con la ayuda de pipetas de Pasteur, este proceso se debe realizar rápidamente sin manchar las paredes de la columna para evitar resultados erróneos al momento de eluir las fracciones.

### 2.3.5.3 Fraccionamiento de columnas según la polaridad y la carga de columna

Luego del análisis general de los metabolitos secundarios por medio de la Cromatografía de Capa Fina, el estudio se enfocó en la búsqueda de compuestos fenólicos, específicamente flavonoides con el fin lograr la mejor separación de los metabolitos.

Se trabajó con un total de ocho columnas cromatográficas, de las cuales seis columnas fueron eluidas con las fases móviles polares y dos columnas fueron eluidas con las fases móviles apolares. De las seis columnas polares, cuatro poseían una carga de columna<sup>1</sup> de 2,5% (375mg) y dos columnas una carga de columna de 5% (750mg), mientras que las dos columnas apolares tuvieron una carga de columna de 2.5% (375mg), tal como se puede observar en la **Tabla 2.2 y 2.3**.

---

<sup>1</sup> La carga de columna es el porcentaje de extracto calculado respecto a la cantidad de sílica usada.



Se usó 15g de silica gel en cada una y se activaron según el **Apartado 2.3.5.1**, luego en cada una se colocó el extracto disuelto en 3,8ml de la mezcla Cloroformo-Metanol-Agua (45:45:10). Para eliminar la clorofila se usó 46ml de Hexano que corresponde a dos volúmenes de carga<sup>2</sup>, en la eliminación total de los pigmentos y de los diferentes tipos de clorofila y dos volúmenes más de las respectivas mezclas: en la columna polar AE-Hexano (50:50) y las apolares de cloroformo-hexano (50:50).

En la elución de los metabolitos se realizó previamente varias pruebas experimentales, variando las proporciones de las fases móviles tomadas de la bibliografía (Wagner & Bladt, 1996). Para las columnas polares se tomó como referencia la fase móvil AE-Ác. Fórmico-Ác. Acético-Agua (100:11:11:26), al agregar metanol a la misma, se obtuvo dos fases móviles de vital importancia en el estudio, la primera AE-Ác. Fórmico-Ác. Acético-Metanol-Agua (80:5:1:10:10) fue usada en la elución de los metabolitos más polares y la segunda AE-Ác. Fórmico-Ác. Acético-Metanol-Agua (30:10:1: 50:10) en el lavado total de los metabolitos menos polares del extracto. En la columna apolar la fase móvil de referencia fue: Cloroformo-acetona-Ác.Fórmico (75:16,5:8,5), para ello se realizaron los siguientes cambios: Cloroformo-Etanol-Agua-Ác. Fórmico- Ác. Acético (51:34:9:5:1) en la primera elución de metabolitos y en la elución total Cloroformo-Etanol-Agua-Ác. Fórmico- Ác. Acético (5:70:14:5:1). El volumen usado en la elución de metabolitos fue de 230ml (10 volúmenes de carga) y en el lavado final 69ml (3 volúmenes de carga).

Se recogió 2 ml de cada fracción en tubos de precipitación codificados por números desde el 1 hasta el 154, a una velocidad de 20 gotas por minuto, las mismas que fueron concentradas al vacío hasta sequedad total. Seguidamente, se redisolvió las fracciones (1 hasta 154) con 0,5 ml de metanol y se realizó análisis TLC, se comparó la fluorescencia y el R<sub>f</sub> de cada una de las manchas cromatográficas formadas en las fracciones individuales, se unió las fracciones con las mismas características en un solo vial, se concentró y se pesó.

---

<sup>2</sup> El volumen de carga, es el volumen de solvente en ml que se usa hasta llegar al final de la columna, dando como resultado que cada volumen de carga es igual a 23ml.



COLUMNAS POLARES					
CÓDIGO DE LAS COLUMNAS	FASES MÓVILES SELECCIONADAS	VOLUMEN DE CARGA	CARGA DE COLUMNA	DISOLUCIÓN DEL EXTRACTO	CANTIDAD DE FRACCIONES INDIVIDUALES RECOLECTADAS POR FASE MÓVIL
COLUMNA 1 COLUMNA 2 COLUMNA 5 COLUMNA 6	Hexano (100%)	2 vol= 46ml	2,5% (375mg)	Cloroformo-METOH- agua (45:45:10) = 3,8 ml	1-15
	AE-Hexano (50:50)	2 vol= 46 ml			16-33
	AE- Ác. Fórmico-Ác. Acético-METOH- Agua (80:5:1:10:10)	10 vol= 230 ml			34-127
	AE- Ác. Fórmico-Ác. Acético-METOH- Agua (30:10:1:50:10)	3 vol= 69 ml			128-154
COLUMNA 7 COLUMNA 8	Hexano (100%)	2 vol= 46ml	5% (750 mg)	Cloroformo-METOH- agua (45:45:10) = 3,8 ml	1-15
	AE-Hexano (50:50)	2 vol= 46 ml			16-33
	AE- Ác. Fórmico-Ác. Acético-METOH- Agua (80:5:1:10:10)	10 vol= 230 ml			34-127
	AE- Ác. Fórmico-Ác. Acético-METOH- Agua (30:10:1:50:10)	3 vol= 69 ml			128-154

**Tabla 2.2** Fraccionamiento en la fase móvil polar del extracto mediante cromatografía de columna.

COLUMNAS APOLARES					
CÓDIGO	FASES MÓVILES	VOLUMEN DE CARGA	CARGA DE COLUMNA	DISOLUCIÓN DEL EXTRACTO	CANTIDAD DE FRACCIONES INDIVIDUALES RECOLECTADAS POR FASE MÓVIL
COLUMNA 3 COLUMNA 4	Hexano (100%)	2 vol= 46ml	2,5% (375mg)	Cloroformo-METOH- agua (45:45:10) = 3,8ml	1-15
	Cloroformo-Hexano (50:50)	2 vol= 46 ml			16-33
	Cloroformo- ETOH- Agua- Ác. Fórmico- Ác. Acético (51:34:9:5:1)	10 vol= 230 ml			34-127
	Cloroformo- ETOH- Agua- Ác. Fórmico- Ác. Acético (5:70:14:5:1)	3 vol= 69 ml			128-154

**Tabla 2.3** Fraccionamiento en la fase móvil polar del extracto mediante cromatografía de columna.



### **2.3.6 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON REVELADOR DE DPPH**

La actividad antioxidante fue determinada en las fracciones unidas de la columna 1, esta prueba consistió en sembrar en una placa de TLC cada fracción unida con el código F1 a la F17, una vez eluida en la fase móvil AE- Ác. Fórmico-Ác. Acético-METOH-Agua (80:5:1: 10:10), se procedió a revelar con DPPH, luego de dejar secar la placa, se visualizó en el equipo de fotodocumentación con luz visible.

La elaboración del DPPH consistió en preparar una concentración de 2,54mM de reactivo, previo a su uso. Para lo cual, se pesó 78,86 mg de 2,2-Difenil-1-picrylhidrazil y se aforo con 80 ml de Metanol, además se usaron los patrones Ácido cafeico y Quercetin-3-glucorónido. (Gu, Wu, & Wang, 2009)

### CAPÍTULO III

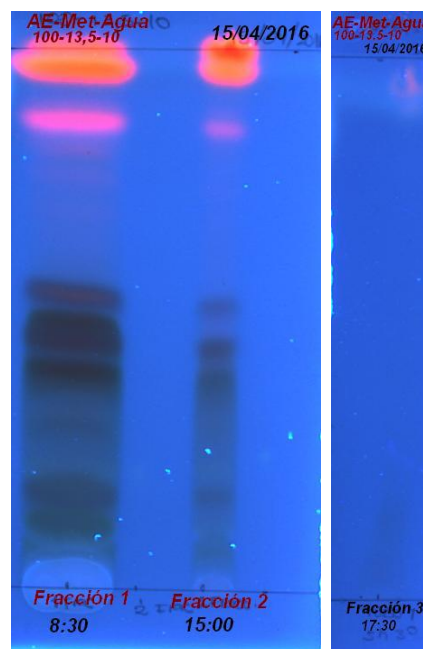
## 3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 3.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS

#### 3.1.1 AGOTAMIENTO DE LA DROGA

Para calcular el agotamiento de la droga en la especie *Desmodium adscendens*, se requirió visualizar las diferentes fracciones obtenidas durante la percolación.

En la **Figura 3.1** tomada con luz UV a una longitud de onda de 366nm, evidencia la reacción negativa antes descrita en el **Apartado 2.3.2.1**, mediante la ausencia de bandas en los cromatogramas, esta reacción nos permite calcular el volumen de metanol exacto necesario para generar el agotamiento de los metabolitos secundarios en la droga, dichos volúmenes se detallan en la **Tabla 3.1, 3.2 y 3.3**.



**Figura 3.1** Agotamiento de metabolitos activos



PERCOLACIÓN DE EXTRACTO FRESCO						
CÓDIGO	PARTE USADA DE LA PLANTA	HORA DE HUMECTACIÓN	HORA DE PERCOLACIÓN	PESO	75%	AGOTAMIENTO DE LA DROGA (ml)
ZAMORA #1	HOJAS	19H00	8H00	16,67 g	12,50 ml	540 ml
ZAMORA #2				24,05 g	18,03 ml	780 ml
ZAMORA #3				12,01 g	9 ml	389 ml
ZAMORA #4				12,02 g	9,01 ml	389.3 ml
ZAMORA #5				12,07 g	9,05 ml	391 ml
ZAMORA #6				12,04 g	9,03 ml	390 ml
ZAMORA #7				12,14 g	9,10 ml	393 ml
ZAMORA #8				12,09 g	9,06 ml	392 ml
ZAMORA #9				18,01 g	13,50 ml	583 ml
ZAMORA #10				18,05 g	13,53 ml	584 ml

*Tabla 3.1* Cálculo del agotamiento de los metabolitos activos de la droga fresca

PERCOLACIÓN DE EXTRACTO SECADO EN HORNO						
CÓDIGO	PARTE USADA DE LA PLANTA	HORA DE HUMECTACIÓN	HORA DE PERCOLACIÓN	PESO	75%	AGOTAMIENTO DE LA DROGA (ml)
ZAMORA #11	HOJAS	18H00	9H00	6,02g	4,51ml	195 ml
ZAMORA #12				6,01g	4,50 ml	194 ml

*Tabla 3.2* Cálculo del agotamiento de los metabolitos activos de la droga seca en horno

PERCOLACIÓN DE EXTRACTO SECADO POR LIOFILIZACIÓN						
CÓDIGO	PARTE USADA DE LA PLANTA	HORA DE HUMECTACIÓN	HORA DE PERCOLACIÓN	PESO	75%	AGOTAMIENTO DE LA DROGA (ml)
ZAMORA #13	HOJAS	18H00	9H00	7,53g	5,65ml	244 ml
ZAMORA #14				8,46g	6,34 ml	274 ml

*Tabla 3.3* Cálculo del agotamiento de los metabolitos activos de la droga seca por liofilización

### 3.1.2 RENDIMIENTO DE LA DROGA

En la **Tabla 3.4** se presenta el rendimiento obtenido para los distintos extractos sometidos a liofilización. Para calcular el rendimiento de los extractos seco se consideró el peso inicial de la droga vegetal del cual se partió para la percolación y el peso obtenido luego de la liofilización, los resultados son expresados  $DER_{NATIVO}^3$ , que indica la cantidad de gramos tratados con el solvente (metanol) para obtener un gramo de extracto vegetal crudo.

*CÓDIGO	GRAMOS DE DROGA USADA	TUBO LIOF. VACIO	TUBO LIOF. + EXTRACTO	EXTRACTO SECO (g)	DER <sub>NATIVO</sub>
ZAMORA #1	16,67g	65,5796g	66,5796g	1,00 g	17:1
ZAMORA #2	24,05g	65,5720g	66,9520g	1,38 g	17:1
ZAMORA #3	12,01g	65,1284g	65,7989g	0,67 g	18:1
ZAMORA #4	12,02g	63,3966g	64,0742g	0,68 g	18:1
ZAMORA #5	12,07g	62,8130g	63,4983g	0,69 g	17:1
ZAMORA #6	12,04g	66,0951g	66,8477g	0,75 g	16:1
ZAMORA #7	12,14g	65,7520g	66,5506g	0,80 g	15:1
ZAMORA #8	12,09g	67,2230g	68,0931g	0,87 g	14:1
ZAMORA #9	18,01g	65,5626g	66,9726g	1,41 g	13:1
ZAMORA#10	18,05g	64,8602g	65,8502g	0,99 g	18:1
ZAMORA#11	6,02g	63,3996g	64,2399g	0,84 g	7:1
ZAMORA#12	6,01g	63,3996g	64,3767g	0,98 g	6:1
ZAMORA#13	7,53g	65,7512g	66,8715g	1,12 g	7:1
ZAMORA#14	8,46g	67,2202g	68,4797g	1,26 g	7:1

**Tabla 3.4** Cálculo del rendimiento del extracto *Desmodium adscendens*

<sup>3</sup>  $DER_{NATIVO}$  es el índice de materia extraíble.

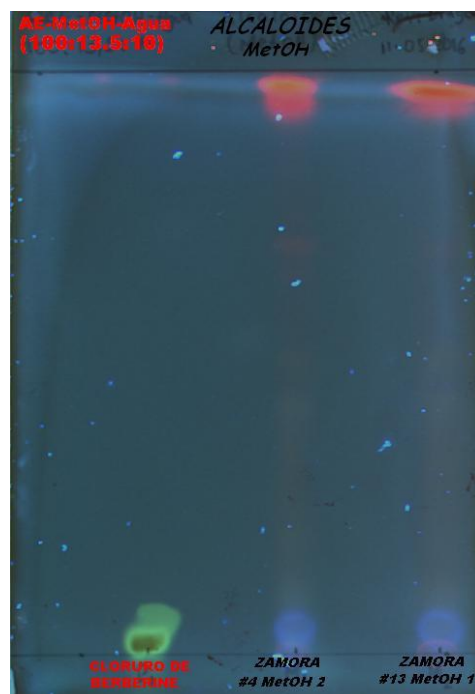
\* La droga usada previa a la percolación tiene las siguientes características: los códigos ZAMORA #1 hasta el #10 fue droga fresca, ZAMORA #11 y #12 droga seca con horno Pro 3, ZAMORA #13 y #14 droga seca mediante liofilización.

### 3.2 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Los procedimientos desarrollados con TLC para la identificación y separación de metabolitos activos se describieron en la **Tabla 2.1**. Diferentes fases móviles y reveladores se usaron para investigar la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas y terpenos. La identificación de los mismos va a depender de la visualización de las manchas o bandas formadas en los cromatogramas, cuyas fluorescencias son específicas bajo luz UV, obteniéndose los siguientes resultados.

#### 3.2.1 ALCALOIDES

Observando el cromatograma en luz UV con longitud de onda de 366nm en la **Figura 3.2**, se aprecia una banda superior con fluorescencia roja que corresponde a la clorofila (pigmento) de las hojas y una banda inferior de color azul, que no corresponde a la fluorescencia verdosa del cloruro de berberine, por lo que se concluye que no existe la presencia de alcaloides en el extracto metanólico.



**Figura 3.2** Determinación de Alcaloides en la fase móvil AE-METOH-Agua (100:13,5:10)



### 3.2.2 FLAVONOIDES

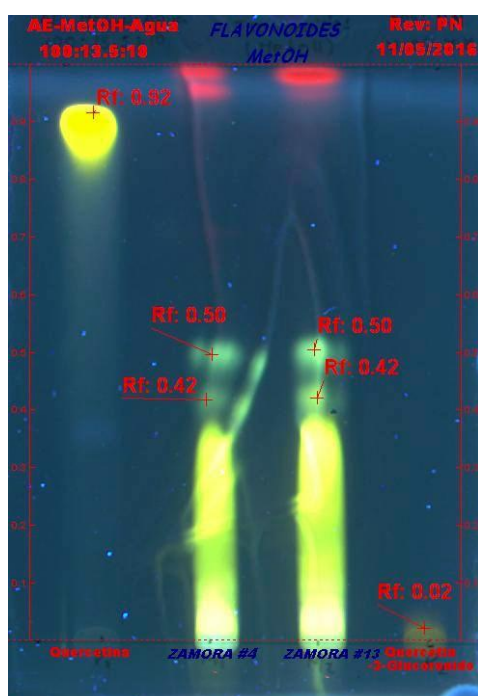
La identificación para flavonoides en el extracto metanólico fue positivo en las fases móviles descritas en la **Tabla 2.1**, la resolución de las bandas presentes en cada una, sirvieron para escoger la selección de la fase móvil en la Cromatografía de Columna. Además, los Rf obtenidos no coinciden con la Quercetina y su glucorónido.

En la **Figura 3.3**, la fase móvil permitió la elución de dos bandas definidas cuyos Rf fueron 0,50 y 0,42; y la elución de una tercera sin separación, por lo que el uso posterior de esta fase móvil fue descartado.

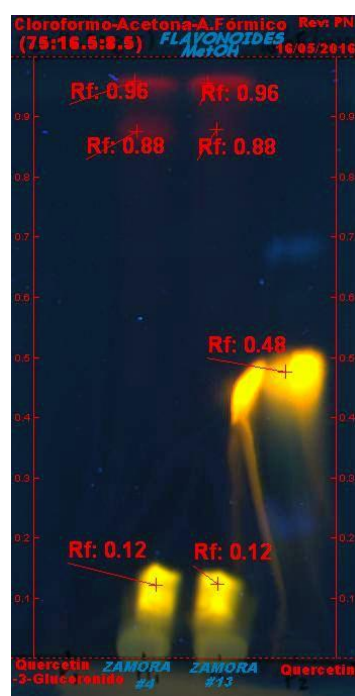
La **Figura 3.4**, mostró una sola banda cromatográfica para compuestos flavonoides con Rf de 0,12, la fase móvil usada mantuvo al compuesto en la parte inferior y la clorofila en la parte superior, siendo esta seleccionada como base para determinar las fases usadas en la Columna apolar.

El cromatograma de la **Figura 3.5**, presenta cinco bandas cromatográficas bien definidas y separadas una de otras, con los siguientes Rf: para la primera banda superior luego de la clorofila corresponde a 0,65; las bandas amarillas dos y tres con Rf 0,58 y 0,45; la cuarta banda verde con 0,27 y la quinta banda 0,19, esta fase móvil sirvió de base para establecer las fases móviles en la Columna polar.

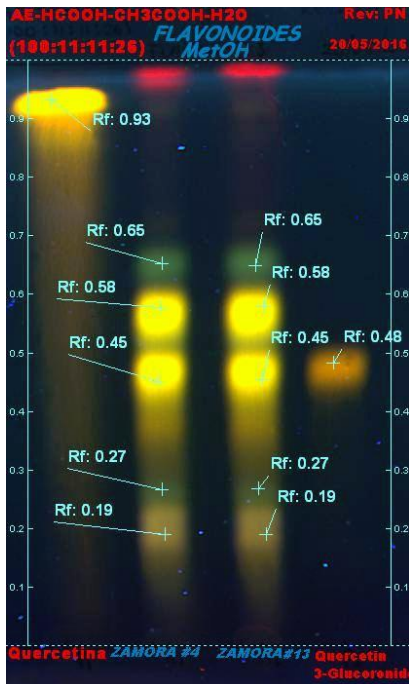
La fase móvil usada en la **Figura 3.6**, si bien muestra la presencia de flavonoides con un Rf de 0,08, pero también fracciona la clorofila dejando varias bandas a lo largo del cromatograma, siendo su uso posterior descartado ya que el fin fue conseguir fases móviles que permitan eluir en primera instancia la clorofila para evitar interferencias.



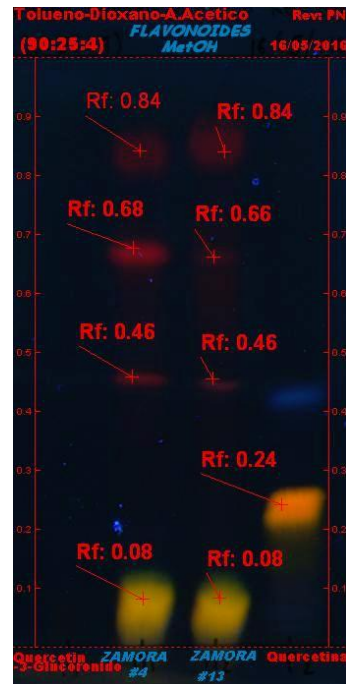
**Figura 3.3** Determinación de Flavonoides en AE-METOH-Agua (100:13,5:10)



**Figura 3.4** Determinación de Flavonoides Cloroformo-Acetona-Ác.Fórmico (75:16,6:8,5)



**Figura 3.5** Determinación de Flavonoides  
AE-Ác. Fórmico-Ác.Acético-Agua (100:11:11:26)



**Figura 3.6** Determinación de Flavonoides  
Tolueno-Dioxano-Ác.Acético (90:25:4)

### 3.2.3 SAPONINAS

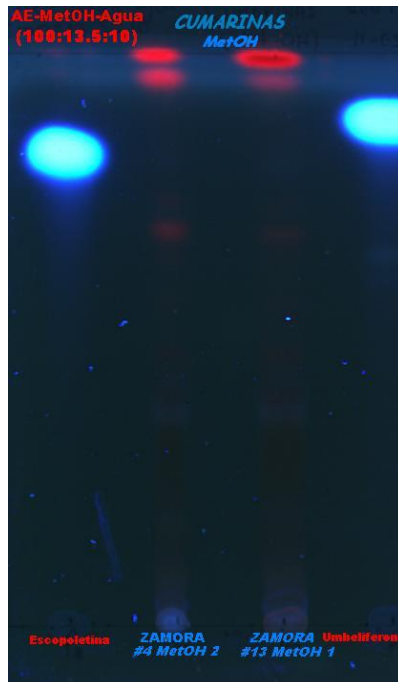
La Identificación de saponinas fue negativa, ya que al usar el Anisaldehído-ácido sulfúrico como revelador, no son detectables a luz visible como se observa en la **Figura 3.7**.



**Figura 3.7** Saponinas, placa eluida en la fase móvil: Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10)

### 3.2.4 CUMARINAS

Al revelar la placa de TLC con KOH 10% en etanol absoluto para cumarinas, a pesar de usar fases móviles de diferente polaridad, no se detectó la presencia de las mismas. Las manchas formadas en la parte inferior sobre la línea de origen de la **Figura 3.8** y **3.9**, son marcas de siembra.



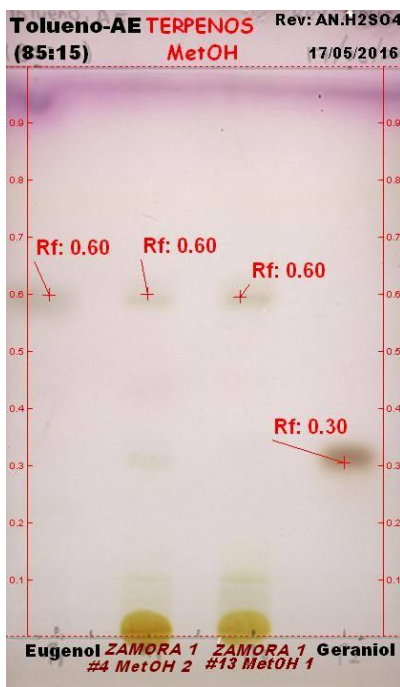
**Figura 3.8** Cumarinas, placa eluida en la fase móvil: AE-METOH-Agua (100:13,5:10)



**Figura 3.9** Cumarinas, placa eluida en la fase móvil Tolueno-AE (93:7)

### 3.2.5 TERPENOS

Los Terpenos con revelador Anisaldehído-ácido sulfúrico a luz visible, tienen un color café marrón, por lo que al observar la **Figura 3.10** y el  $R_f$  de 0,60 entre el patrón y las muestras se determinó la presencia de Eugenol, el cual es un líquido oleoso de color amarillo pálido, cuya fórmula química es 2-Metoxi-4-(2-propenil)fenol, presenta propiedades antisépticas y analgésicas, debido a sus características puede ser usado como derivado fenólico y terpeno. (González, 2002)



**Figura 3.10** Terpenos, placa eluida en la fase móvil Tolueno-AE (85:15)

## 3.3 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

### 3.3.1 SELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL

La columna con mejor resultados obtenidos fue la Columna 1, la misma que para su fraccionamiento se usaron diferentes fases móviles de carácter polar, tomando en cuenta la resolución de las bandas en el cromatograma en la luz UV a una longitud de onda de 366nm.

El uso del ácido fórmico en ambas columnas fue de vital importancia para la eficiencia<sup>4</sup> de las bandas formadas ya que facilita la ionización, asegurando protonación<sup>5</sup> del analito. (Wu, et al., 2004)

<sup>4</sup> EFICIENCIA: Disposición de una cromatografía visible, en este caso con manchas definidas y distribuidas para un análisis y discusión cromatográfica.

<sup>5</sup> PROTONACIÓN: Es la adición protón a la molécula.

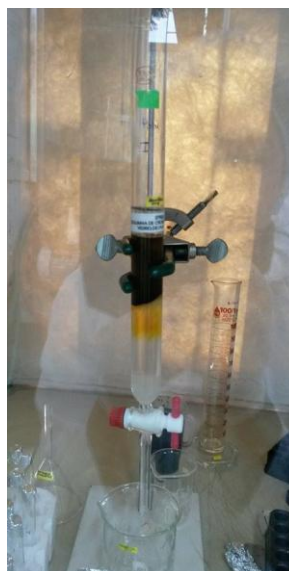
A continuación, se presenta los resultados obtenidos:

### 3.3.1.1 Elución de Clorofila

La clorofila es un pigmento que proporciona el color verde presente en las plantas, pero existen otros pigmentos como los carotenos y las xantofilas, fue necesario usar fases móviles que permitan la elución de pigmentos en primera instancia, consiguiendo una mejor visualización de las bandas en las fracciones posteriores. (Lallana, 2003)

Para la elución de la clorofila se decidió usar dos fases móviles, la primera el Hexano, tanto en la columna polar como en la apolar, observándose la salida de pigmento de color amarillo anaranjado que corresponde a la clase de las xantofilas, desde la fracción<sup>6</sup> 1 a la 15, las mismas que no son visibles a la longitud de onda de 366nm, como se muestra en la **Figura 3.11** y **3.12**.

La segunda fase móvil usada en la columna polar fue AE-Hexano (50:50), recogida en las fracciones 16 a la 33, observándose en la **Figura 3.13** la elución de la clorofila que con una longitud de onda de 366 nm se muestra de color rojo con un  $R_f$  de 0,99; además en la fracción 28 a la 32 se observa la aparición de una nueva banda cuyo  $R_f$  es 0,92; de color amarillo pálido apareciendo ya la elución de los primeros compuestos. Mientras que en la columna apolar se usó Cloroformo-Hexano (50:50), en donde hubo solo la elución de clorofila en toda la placa de la **Figura 3.13**.



**Figura 3.11** Elución de compuestos con Hexano 100%

<sup>6</sup> Fracción o fracciones es el término utilizado, para expresar al extracto eluido en cada tubo de vidrio, encontrándose de manera individual, cuando se hable de F, refiere a las fracciones individuales con las mismas características unidas en una sola.



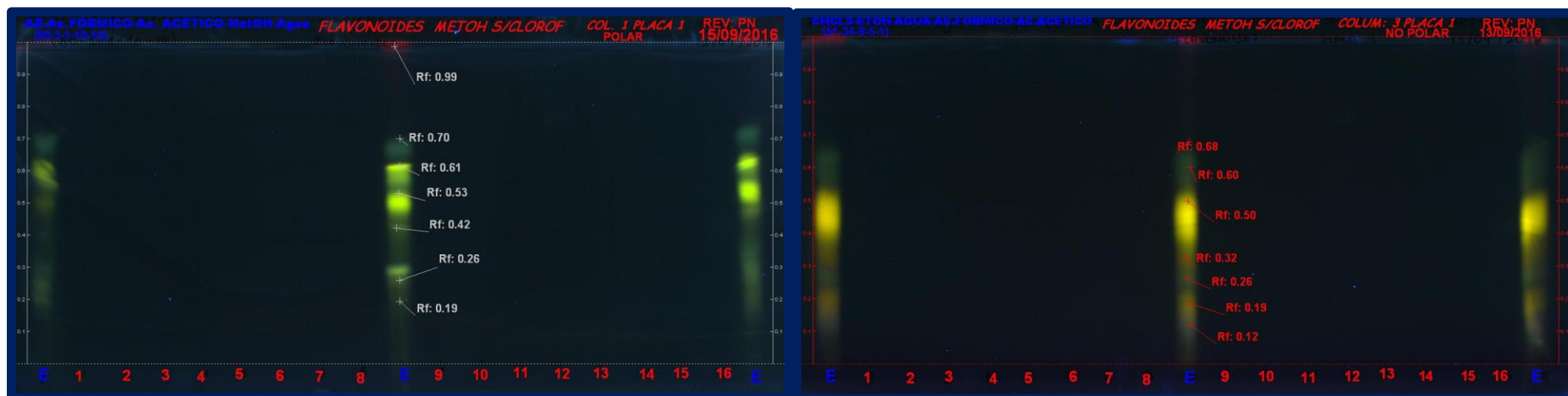


Figura 3.12 Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 1 a la 16

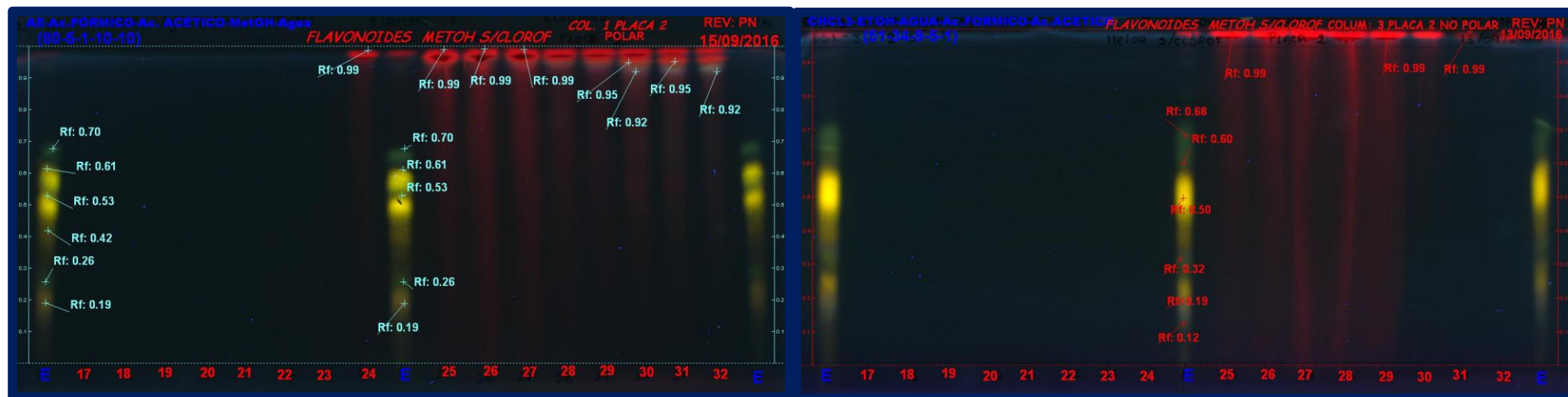


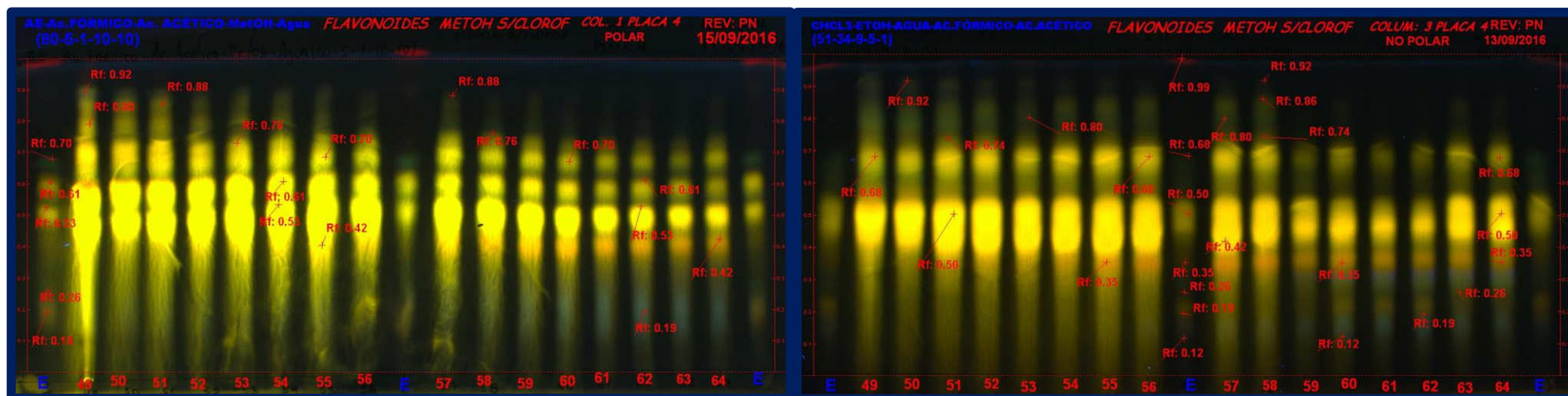
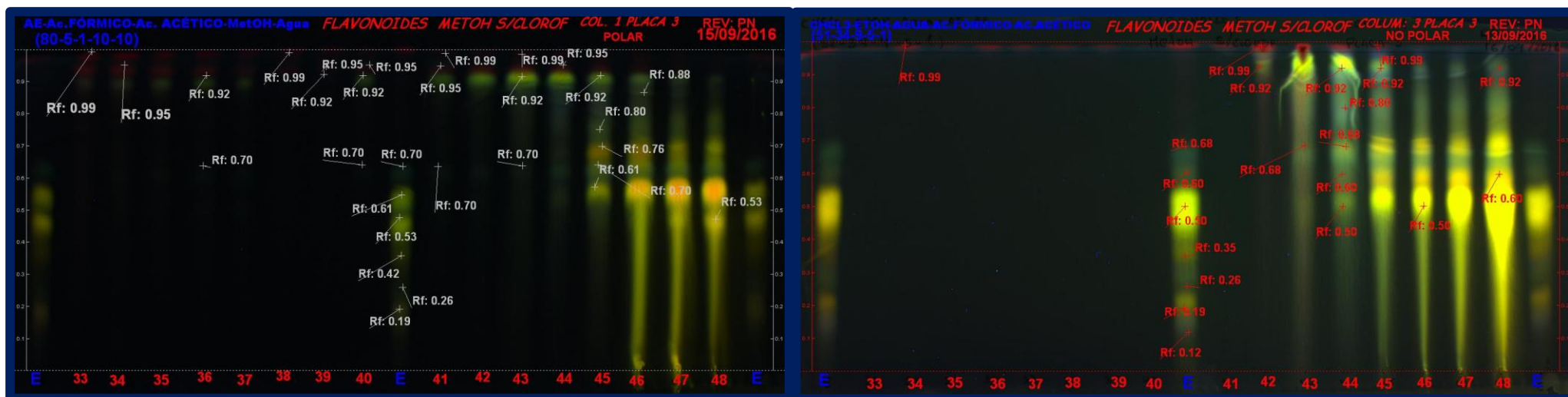
Figura 3.13 Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 17 a la 32

### 3.3.1.2 Elución de metabolitos

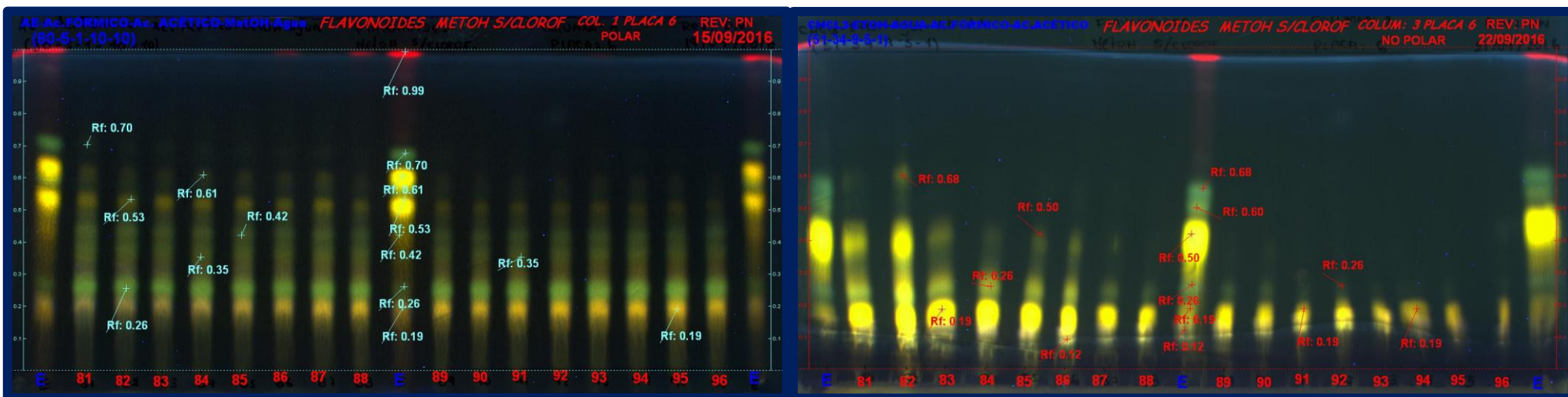
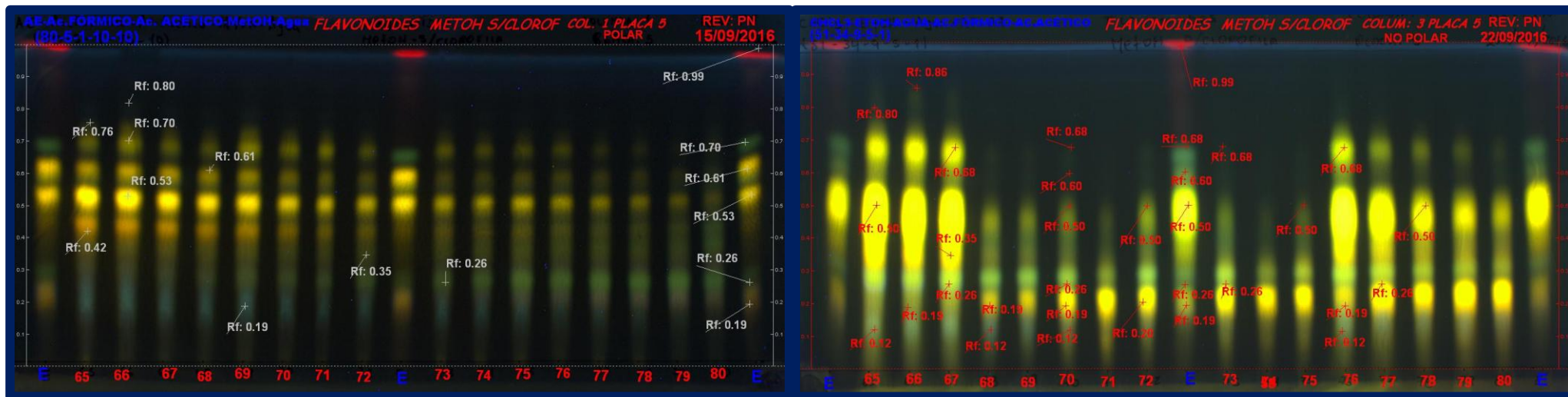
Se denomina elución de metabolitos porque se refleja la elución de la mayor cantidad de bandas cromatográficas, que pueden ser evidenciadas en las **Figuras 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 y 3.19**, en ambas columnas polar y apolar.

La fase móvil Acetato Etilo- Ácido Fórmico-Ácido Acético-Metanol-Agua (80:5:1:10:10) usada en la columna polar presenta mejores resultados que la fase móvil Cloroformo-Etanol- Agua- Ácido Fórmico-Ácido Acético (51:34:9:5:1) usada en la columna apolar, a pesar que las bandas formadas tienen ciertas similitudes en cuanto a fluorescencias, la elución y el número de bandas formadas es diferente, viéndose notable afinidad de los compuestos en la fase móvil polar ya que la elución empieza desde la fracción 33 como se mencionó anteriormente y existe dos bandas centrales de fluorescencia amarilla intensa correctamente definidas con los  $R_f$  0,61 y 0,53 ,respectivamente, que persisten desde la fracción 47 hasta la 128, en las ultimas siendo leve. En cambio, la elución de la fase móvil apolar empieza recién en la fracción 42 y existe una sola banda central amarilla intensa que perdura hasta la fracción 87.

También se determina que hasta la fracción 128 en la columna con la fase móvil polar se mantuvo una constante elución, quedando esta con 7 bandas en el cromatograma, pero la muestra en la fase móvil apolar en la misma fracción ya empieza a agotarse, manteniendo solo tres bandas en el cromatograma hasta ese momento, por lo que se manifiesta que debido a que no existe afinidad de los compuestos por esta fase móvil se quedan compactados en la parte inferior de la placa, haciendo que eluyan más rápidamente tal como se muestra en la **Figura 3.19**.







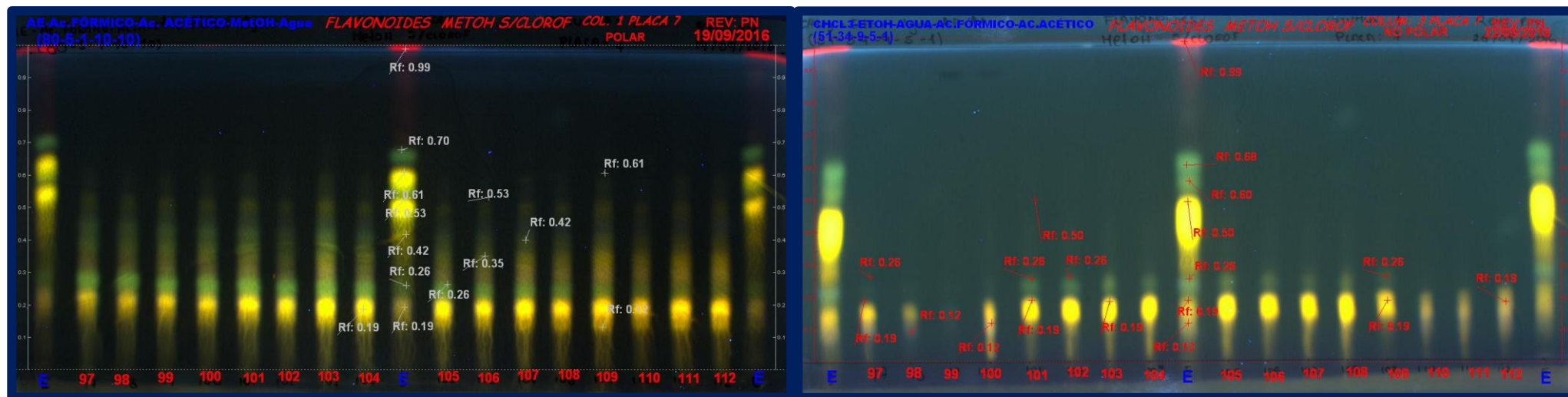


Figura 3.18 Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 97 a la 112

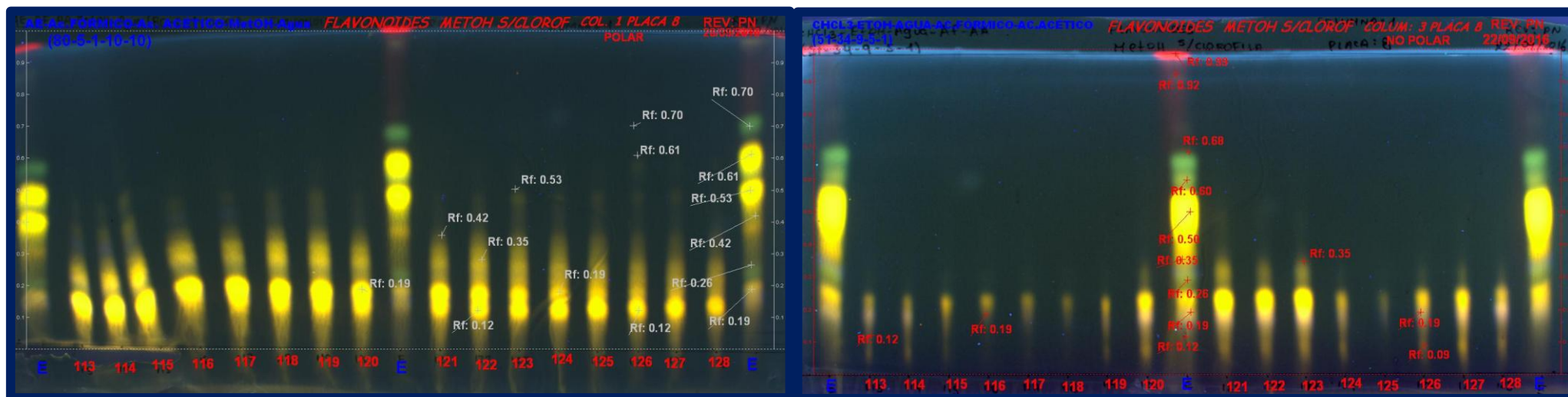


Figura 3.19 Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 113 a la 128

### 3.3.1.3 *Elución Total*

En el lavado final de las columnas se usó para la fase móvil polar Acetato Etilo- Ácido Fórmico-Ácido Acético-Metanol-Agua (30:10:1:50:10) y para la apolar Cloroformo-Etanol- Agua- Ácido Fórmico-Ácido Acético (5:70:14:5:1), debido a la mayor cantidad de Metanol y Etanol presentes respectivamente en cada columna aumenta la afinidad de los compuestos por la fase móvil, abandonando el lecho de la silica gel, permitiendo el agotamiento del extracto sembrado y que las bandas ya no sean visibles en el equipo de fotodocumentación. **Figura 3.21**

### 3.3.1.4 *Miscibilidad*

La composición de las fases móviles polares descritas previamente, debido a su solubilidad y miscibilidad con el agua forman una sola fase homogénea lo que permite que el fraccionamiento de las bandas sea el óptimo, permitiendo obtener bandas bien definidas. Mientras que la composición de las fases móviles apolares debido a que el cloroformo es insoluble e inmiscible con el agua, que al dejar en reposo en la cámara de TLC hace que se forme una solución bifásica, lo que evita que los compuestos eluyan fácilmente y la silica gel se agriete, como se puede documentar en las **Figura 3.17**. (Ñuñez, 2008)

La unión de las fracciones se realizó, reuniendo a todas las fracciones individuales que contengan las mismas características, es decir, el mismo número de bandas, con iguales  $R_f$  y fluorescencias, en una solo vial bajo el código de F, las fracciones unidas se pueden revisar en la **Figura 3.25** en el **Apartado 3.3**, y los  $R_f$  en la **Tabla 3.5**.



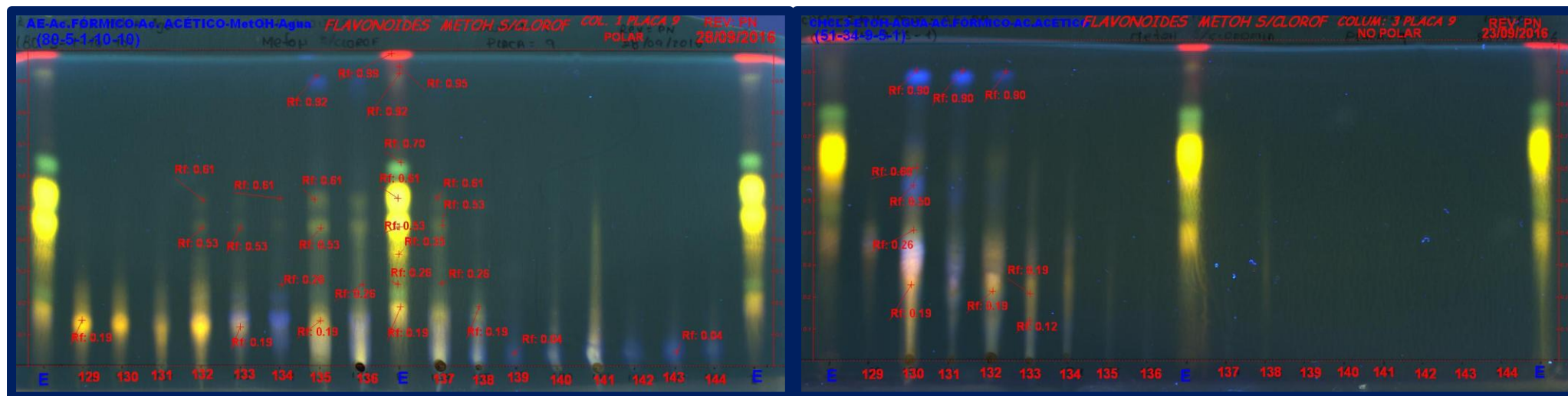


Figura 3.20 Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 129 a la 144

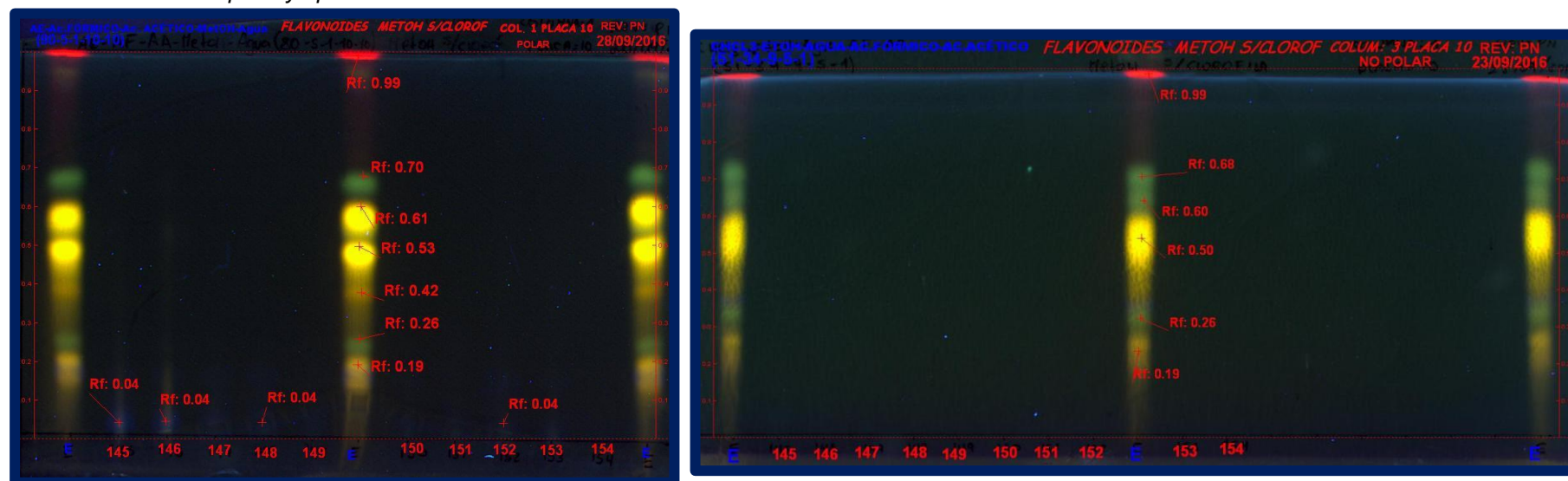


Figura 3.21 Elución en la fase móvil polar y apolar de Fracciones 145 a la 154



<b>DESCRIPCIÓN:</b>	<b>COLUMNA: 1</b> <b>POLARIDAD: POLAR</b> <b>CARGA DE COLUMNA: 2,5%</b> <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES: 2mg/ml</b> <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN: AE-Ac.Fórmico- Ac. Acético-METOH-Agua (80-5-1-10-10)</b> <b>REVELADOR: PRODUCTOS NATURALES</b>		
<b>CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS</b>
1-22	-----	F1	-----
23-27	0,99	F2	0,99
28-32	0,99 0,95 0,92	F3	0,99 0,95 0,92
33-42	0,99 0,95 0,92 0,70	F4	0,99 0,95 0,92 0,70
43-44	0,99 0,95 0,92 0,80 0,76 0,70 0,61	F5	---- 0,95 0,92 --- 0,76 0,70 0,61
45-48	0,95 0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53	F6	---- 0,92 ---- ---- 0,76 0,70 0,61 0,53
49-56	0,92 0,88 0,80	F7	---- 0,88 ----



	0,76 0,70 0,61 0,53 0,42		0,76 0,70 0,61 0,53 0,42
57-66	0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,19	F8	---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53 0,42 0,19
67-81	0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F9	---- ---- 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19
82-103	0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F10	0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19
104-115	0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F11	---- ---- ---- 0,35 0,26 0,19
116-125	0,53	F12	----



	0,42 0,35 0,26 0,19 0,12		---- 0,35 0,26 0,19 0,12
126-132	0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F13	---- ---- ---- ---- 0,26 0,19 0,12
133-134	0,61 0,53 0,26 0,19 ----	F14	---- ---- 0,26 0,19 0,12
135-136	0,92 0,61 0,53 0,26 0,19	F15	---- ---- ---- 0,26 0,19
137-138	0,61 0,53 0,26 0,19	F16	Marcas de siembra
139-154	0,04	F17	0,04

**Tabla 3.5** Documentación de los Rf en la Columna Polar 1



<b>DESCRIPCIÓN:</b>	<b>COLUMNA: 3</b> <b>POLARIDAD: APOLAR</b> <b>CARGA DE COLUMNA: 2,5%</b> <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES: 2mg/ml</b> <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN: Cloroformo- ETOH- Agua- Ác. Fórmico-Ác. Acético (51:34:9:5:1)</b> <b>REVELADOR: PRODUCTOS NATURALES</b>		
<b>CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS</b>
1-24	-----	F1	-----
25-30	0,99	F2	0,99
31-41	0,99	F3	0,99
42-43	0,99 0,92 ---- 0,68	F4	0,99 0,92 0,80 ----
44	0,99 0,92 0,80 0,68 0,60 0,50	F5	---- 0,92 0,80 ---- ---- ----
45-48	0,99 0,92 0,80 ---- 0,68 0,60 0,50	F6	---- ---- 0,80 0,74 0,68 ---- 0,50
49-53	0,92 0,80 0,74 0,68 0,50 0,35	F7	---- 0,80 0,74 0,68 0,50 ----
54-58	0,92 0,86	F8	---- ----





	0,74 0,68 0,50 0,42 0,35		0,74 0,68 0,50 ---- ----
59-67	0,86 0,80 0,68 0,50 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F9	---- ---- ---- 0,50 ---- 0,35 0,26 0,19 0,12
68-75	0,68 0,60 0,50 0,35 0,26 0,19 ----	F10	---- ---- ---- ---- 0,26 0,19 0,12
76-82	0,68 0,50 0,26 0,19 0,12	F11	---- 0,50 0,26 0,19 0,12
83-87	0,68 0,50 0,35 0,26 0,19 0,12	F12	---- ---- ---- 0,26 0,19 0,12
88-99	0,26 0,19 ----	F13	0,26 0,19 0,12
100-109	0,26	F14	0,26



	0,19		0,19
110-119	0,19 0,12	F15	0,19 ----
120-129	0,19 0,12 0,09	F16	0,19
130-132	0,90 0,60 0,50 0,26 0,19 ---- ----	F17	---- ---- ---- ---- ---- 0,12 0,09
133-138	0,19 0,12	F18	----
139-154	-----	F19	----

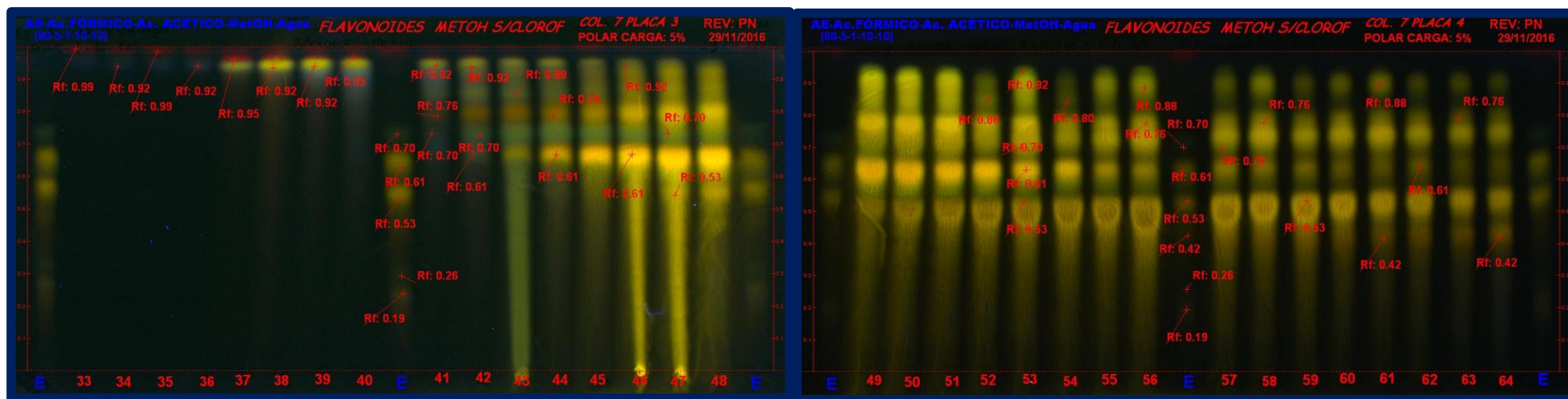
**Tabla 3.6** Documentación de los Rf en la Columna Apolar 3



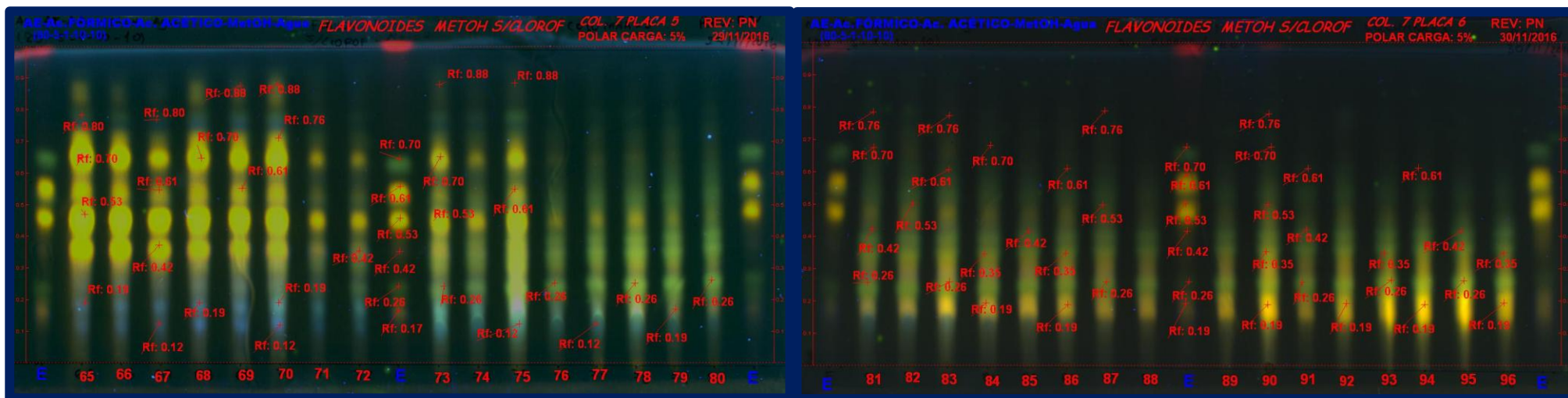
### 3.3.2 CARGA DE COLUMNA

Al comparar las columnas con una carga de 2,5% y 5% de extracto, que corresponden a la columna 1 y la columna 7 respectivamente, se determinó que la columna 1 obtuvo la mejor resolución de las bandas, debido a la presencia paulatina de las mismas en las fracciones.

El número de bandas evidenciadas en el cromatograma dependen directamente de la concentración del extracto en la placa, al tener más concentración en la columna 7 hace que los  $R_f$  se encuentren ocultos por otras bandas cuyo color puede ser más intenso, siendo indetectables al ojo humano, lo que hace que se unan más fracciones en un solo vial por sus características aparentes, siendo así que para esta columna existe un total de F14, a diferencia de la columna 1 con un total de F17, por lo que a una menor concentración hay mejor visualización de las bandas pudiendo ser Fotodocumentadas, como es el caso de la banda con fluorescencia verde con  $R_f$  0,70, en la columna 1 aparece desde la fracción 33, mientras que en la columna 7 es reflejada en la fracción 41. Dicha comparación entre la columna 1 y 7 se puede observar con la fase móvil polar en las **Figuras 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24** y en las **Tablas 3.5, 3.7**.



**Figura 3.22** Elución de las Fracciones 33 a la 64 de la Columna Polar 7 con carga de columna del 5%



**Figura 3.23** Elución de las Fracciones 65 a la 96 de la Columna Polar 7 con carga de columna del 5%

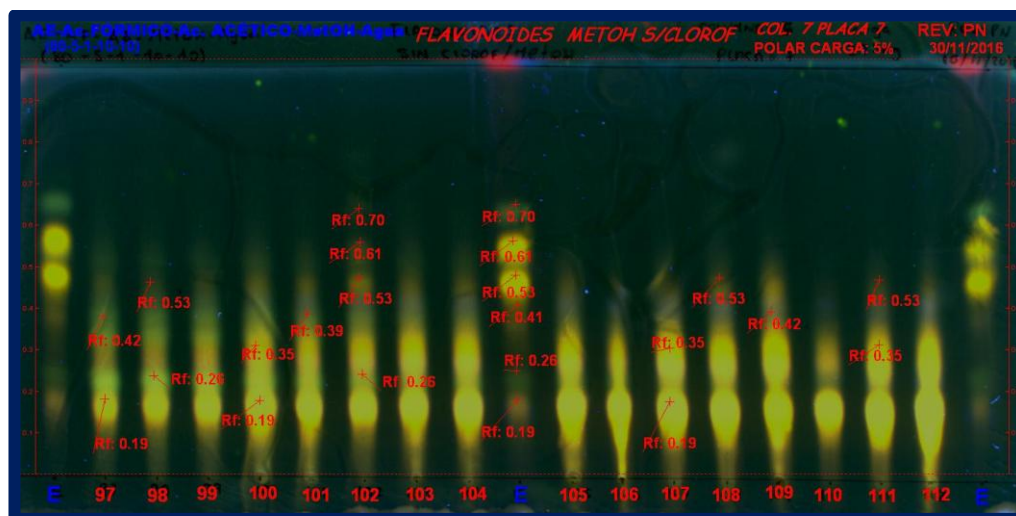


Figura 3.24 Elución de las Fracciones 97 a la 112 de la Columna Polar 7 con carga de columna del 5%

DESCRIPCIÓN:	<b>COLUMNA: 7</b> <b>POLARIDAD: POLAR</b> <b>CARGA DE COLUMNA: 5%</b> <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES: 2mg/ml</b> <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN: AE-Ac.Fórmico- Ac. Acético-METOH-Agua (80-5-1-10-10)</b> <b>REVELADOR: PRODUCTOS NATURALES</b>		
CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES	RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES	CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS	RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS
1-20	----	F1	----
21-24	0,99	F2	0,99
25-36	0,99 0,95 0,92 ----	F3	0,99 ---- 0,92 0,88
37-40	---- 0,95	F4	0,99 ----



	0,92 ----		0,92 0,88
41	0,92 ---- ---- 0,76 0,70	F5	---- 0,88 0,80 0,76 ----
42-53	0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53	F6	---- ---- ---- 0,76 0,70 0,61 0,53
54-64	0,92 0,88 0,76 ---- 0,61 0,53 0,42	F7	---- ---- 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42
65-70	0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,26 0,19 0,12	F8	---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53 0,42 ---- ---- ----
71-75	0,88 0,80 0,76 0,70 0,61	F9	---- ---- ---- 0,70 0,61



	0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12		0,53 0,42 0,26 ---- ---- ----
76-106	0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F10	---- ---- ---- ---- ---- ---- 0,26 0,19
107-128	0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F11	---- ---- ---- ---- 0,19 ----
129-133	0,19 0,12	F12	---- ----
134-144	0,04	F13	----
145-154	----	F14	----

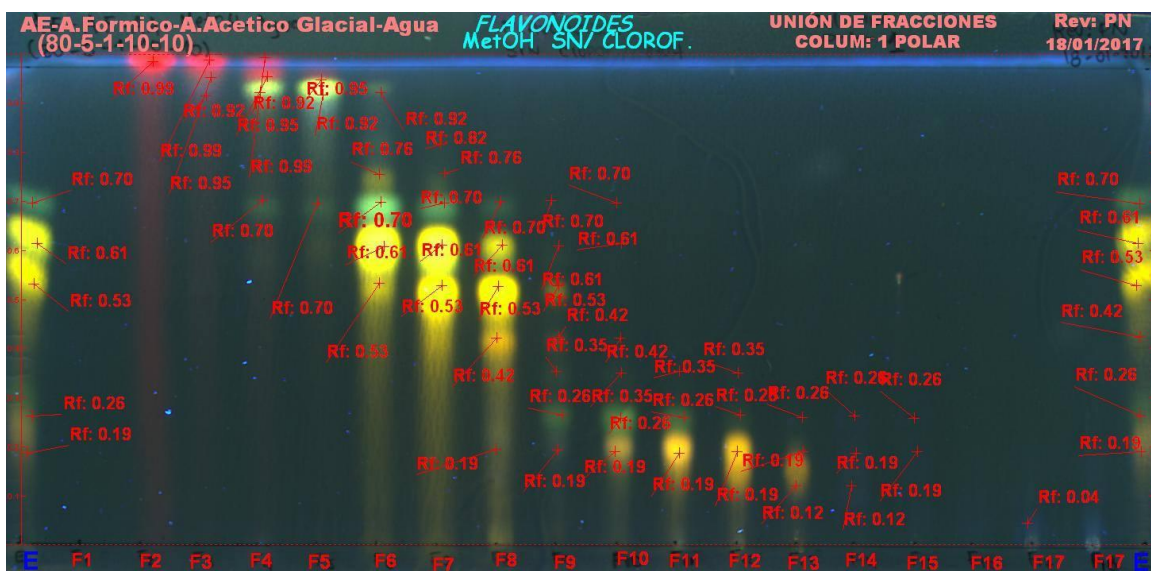
**Tabla 3.7** Documentación de los  $R_f$  en la Columna Polar 7 con carga de columna del 5%



### 3.3.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS

Al unir las fracciones, nos brinda una mejor identificación y cuantificación de los compuestos presentes en la Columna 1.

En la **Tabla 3.8**, se realiza una identificación de los analitos presentes a breve rasgos basándonos en la fluorescencia producida por la **Figura 3.25**.



**Figura 3.25** Elución de las fracciones unidas en la Columna Polar 1

Fluorescencia	Analito identificado	Rf
Roja	Clorofila	0,99 y 0,95
Amarilla fosforescente	Ácidos fenólicos	0,92
Amarilla intensa	Flavonoles	0,61; 0,53; 0,19; 0,12
Anaranjada	Flavonas	0,42 y 0,35
Amarilla verdosa	Flavonas	0,70 y 0,26

**Tabla 3.8** Fluorescencias fotodocumentadas en las fracciones unidas de la columna 1

Según la bibliografía (Wagner & Bladt, 1996), los tipos de flavonoles con fluorescencia amarilla son la quercetina, miricetina y sus glucósidos; anaranjada corresponde a la flavona luteolina y la amarilla verdosa a la flavona apigenina.





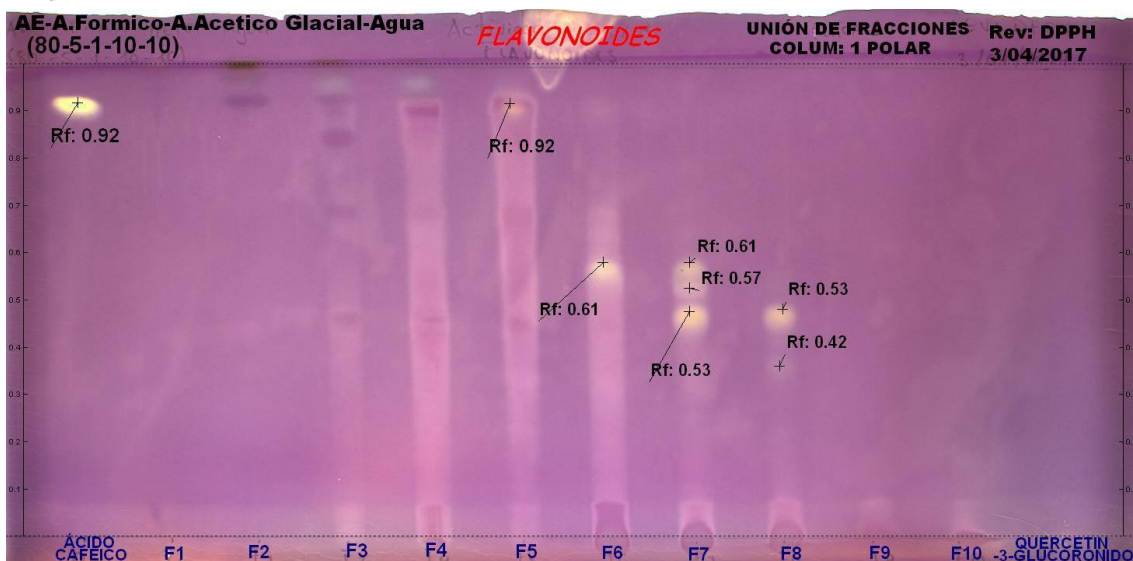
A continuación, se muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de los analitos presentes en la F1 hasta la F17.

CÓDIGO	VIAL VACIO	VIAL + CADA FRACCIÓN	CANTIDAD DE EXTRACTO EN LAS FRACCIONES UNIDAS (mg)
F1	2,8072 g	2,8075 g	0,3 mg
F2	2,7675 g	2,7765 g	9,0 mg
F3	2,7685 g	2,7782 g	9,7 mg
F4	2,7829 g	2,7861 g	3,2 mg
F5	2,7811 g	2,7860 g	4,9 mg
F6	2,7786 g	2,8256 g	47 mg
F7	2,7734 g	2,8290 g	55,6 mg
F8	2,7858 g	2,8194 g	33,6 mg
F9	2,8069 g	2,8464 g	39,5 mg
F10	2,7993 g	2,8435 g	44,2 mg
F11	2,7759 g	2,7976 g	21,7 mg
F12	2,7423 g	2,7598 g	17,5 mg
F13	2,7456 g	2,7561 g	10,5 mg
F14	2,8142 g	2,8215 g	7,3 mg
F15	2,7729 g	2,8021 g	29,2 mg
F16	2,7590 g	2,7733 g	14,3 mg
F17	2,7530 g	2,7716 g	18,6 mg

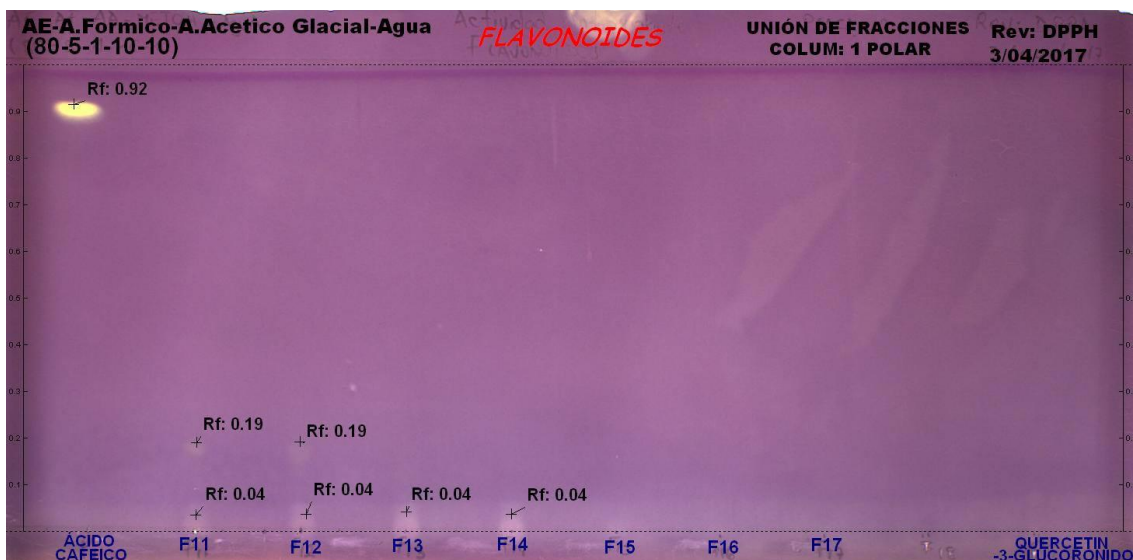
**Tabla 3.9** Cuantificación de analitos en mg

### 3.4 DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON DPPH

La detección de la actividad antioxidante de los compuestos flavonoides aislados por la Cromatografía de Columna, se realizó usando el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo como revelador, obteniéndose resultados positivos en las F5-F6-F7-F8-F11-F12-F13 y F14 visualizándose una fluorescencia blanca amarillenta con fondo púrpura a la luz visible (Gu, Wu, & Wang, 2009), cuyos  $R_f$  0,92; 0,61; 0,53; 0,42 y 0,19 coinciden con la fluorescencia amarilla intensa descrita en el **Apartado 3.3**, correspondiendo a los flavonoides del tipo flavonoles (quercetina, miricetina y sus glucósidos).



**Figura 3.26** Detección de la actividad antioxidante con DPPH como revelador en la Columna 1 del F1 al F10



**Figura 3.27** Detección de la actividad antioxidante con DPPH como revelador en la Columna 1 del F11 al F17



## CAPÍTULO IV

### 4 CONCLUSIONES

Mediante la especie de estudio *Desmodium adscendens* es posible plantear las siguientes conclusiones:

- Al realizar variaciones en la formulación y proporción de las fases móviles descritas en la identificación de flavonoides, fue posible determinar que los flavonoides tienen mayor afinidad a la fase móvil polar debido a que obtuvo una mejor separación y resolución de las bandas cromatográficas.
- Se considera a la Columna 1 con carga de columna de 2,5%, la columna con mejores resultados ya que en esta se puede visualizar correctamente las bandas formadas en el cromatograma, sin interferencias por el exceso de muestra que pueda opacar a otras bandas, permitiendo, unir las fracciones y cuantificar las mismas.
- Mediante el revelado con el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo se confirma la actividad antioxidante del *Desmodium adscendens* tal como se describe en la literatura, específicamente para los flavonoles.
- Se logró aislar y purificar los metabolitos activos con actividad antioxidante de la especie mencionada anteriormente, mediante la Cromatografía de Columna, pero debido a que el llenado de las columnas se realizó de manera manual e individual hizo que los tiempos de retención del extracto en cada columna variaran, por lo que la secuencia de los analitos contenidos en las fracciones no sea la misma, impidiendo la reproducción de resultados y por ende no se logró estandarizar la metodología.
- Debido a que existe factores que no se pueden controlar en un método manual como la temperatura y humedad relativa, que varían inter-día e intra-día, además a las grandes cantidades de volúmenes de solventes usados, así como su tiempo de elaboración de la metódica, no se considera factible usar la cromatografía de columna como método de extracción.



## CAPÍTULO V

### 5 RECOMENDACIONES

De acuerdo a la experiencia obtenida, se sugiere tomar en cuenta la siguiente recomendación:

Para obtener mejores resultados, que pudieran llegar a ser reproducibles y analizados estadísticamente, se aconseja realizar el llenado y el vertido de los solventes de cada columna de manera simultánea, por lo que se recomienda la integración de varios participantes en el proceso.



## BIBLIOGRAFÍA

- Acero, B., Millones, E., Ticona, D., & Torres, L. (2012). Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Desmodium adscendens* en el modelo murino de asma. *CIMEL*, 17(2), 62-64.
- Ansaloni, R., León, F., Orellana, A., Peñaherrera, E., Tobar, V., & Witte, P. d. (Diciembre de 2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*, 23(1), 89-97.
- Astudillo, A. (Diciembre de 2003). Fitoterápicos, Antibacterianos y Antifúngicos. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas 1(2), 44.
- Boluda, C., Duque, B., & Aragón, Z. (2005). Lignanos: estructura y funciones en las plantas. *Fitoterapia*, 5(1), 55-68.
- Burriel Martí, F., Lucena Conde, F., Arribas Jimeno, S., & Hernández Méndez, J. (2008). *Química Analítica Cualitativa*. Madrid-España: Thomson Editores Spain Paraninfo S.A.
- Castillo, S. (2011). *Laboratorio de Química Orgánica*. Obtenido de <https://es.scribd.com/doc/63927220/Laboratorio-Quimica-Organica>
- Centro Universitario de los Lagos. (2014). *Separación de Mezclas Homogéneas por Cromatografía en Capa Fina*. Obtenido de <file:///C:/Users/tatis/Downloads/PRACTICA%204%20QO-2014A.pdf>
- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (Junio de 2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-211.
- Correa Cueva, L. (26 de Mayo de 2015). *Análisis Cromatográfico y de Masas*. Obtenido de <http://es.slideshare.net/Calexislbal/cromatografa-de-columna>
- Correa Cuevas, D. (26 de Mayo de 2015). *Cromatografía de Columna*. Obtenido de <http://es.slideshare.net/Calexislbal/cromatografa-de-columna>
- Criollo, K., & Molina, J. (s.f.). "EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE DISTINTOS PROCESOS DE SECADO DE *Jungia rugosa*". Universidad de Cuenca, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Cuenca.
- EcuRed. (2017). *EcuRed*. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Alcaloide>
- F. Striegel, M., & Hill, J. (1996). *Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis*. United States of America: The J.Paul Getty Trust. Obtenido de [https://www.getty.edu/conservation/publications\\_resources/pdf\\_publications/pdf/thin\\_layer.pdf](https://www.getty.edu/conservation/publications_resources/pdf_publications/pdf/thin_layer.pdf)
- Facultad Química UNAM. (2013). *Terpenos*. Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Lipidos2\\_32474.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Lipidos2_32474.pdf)
- Fernández K. (2007). *Caracterización de Taninos*. Obtenido de <http://www.feng.pucrs.br/laboratorios/taninos/restrito/caracterizacion-taninos.pdf>
- Freitas, D. M. (2012). *Universidade Federal de Santa Catarina; Centro de Ciências Biológicas*. Obtenido de *Desmodium* Desv.: <http://laveg.paginas.ufsc.br/files/2012/08/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Desmodium-Freitas-2012.pdf>
- Furuken, M. (2006). *Cromatografía- Equilibrios de Absorción y Partición*. Obtenido de [http://www.geocities.ws/ttpmodulo2/08\\_Cromatografia\\_Apuntes\\_2006.pdf](http://www.geocities.ws/ttpmodulo2/08_Cromatografia_Apuntes_2006.pdf)
- Gaedcke, Frauke, Steinhoff, & Königswinter. (2003). *Herbal Medicinal Products*.
- García, L. A. (s.f.). *Leguminosas espontáneas del valle del Cauca*. Obtenido de [http://www.accefyn.org.co/revista/Volumen\\_11/42/52-83.pdf](http://www.accefyn.org.co/revista/Volumen_11/42/52-83.pdf)
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. *Ámbito Farmacéutico Nutrición*, 23(6), 80-84.
- Girbes, T., & Jiménez, P. (2013). *Taninos*. Obtenido de [https://alojamientos.uva.es/guia\\_docente/uploads/2013/470/45820/1/Document o48.pdf](https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2013/470/45820/1/Document o48.pdf)



- Gonzales, B. (2015). *Cumarinas*. Obtenido de Academia: <http://www.academia.edu/4019758/CUMARINAS>
- González, R. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2).
- Gu, L., Wu, T., & Wang, Z. (2009). TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *LWT-Food Science and Technology*(42), págs. 131-136. Obtenido de <http://jpkc.shutcm.edu.cn/trywhx/PDF/WZT/%E6%96%87%E7%AB%A0/2009/Gu%20LH-TLC-FST.pdf>GRUPO HAIYANG YINHAI ESPAÑA, S.L. (s.f.). Obtenido de <http://www.geldesilice.com/es/productos/productos-de-gel-de-silicesilicagel/gel-de-silice-para-cromatografia-en-columnas/27/10/11>
- Guija, E., Inocente, M. Á., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). *Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrihidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante*. Obtenido de Scielo: <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf>
- Ioanna, C. (2008). Primary and Secondary Metabolites and Their Biological Activity. En W. M. Hajnos, J. Sherma, & T. Kowalska, *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (Vol. 99, pág. 60). London, New York: Taylor & Francis Group.
- Lallana, V. H. (2003). *Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal*. Obtenido de [http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m\\_didactico/manual\\_practicas/ExtPig\\_bED.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/ExtPig_bED.pdf) Luengo, M. L. (Abril de 2002). *Fitoterapia. Ámbito Farmacéutico*, 21(4), 108-113.
- Manzo, R. Á. (2016). *Ruta Ácido Shikímico*. Obtenido de Slideshare: <https://www.slideshare.net/xiuhts/farma-3-59142867>
- Méndez, Á. (30 de Junio de 2011). *LA GUÍA*. Obtenido de <http://quimica.laguia2000.com/general/cromatografia>
- Mercola, J. (2015). *Actividad de los antioxidantes frente a los radicales libres*. Obtenido de Mercola: <http://articulos.mercola.com/antioxidantes.aspx>
- Montealegre, L., & Bayona, L. (2011). *Identificación de lignanos en algunos productos vegetales*. Obtenido de Scribd: <https://es.scribd.com/doc/56502515/Lignanos>
- Mosquera, W. (2014). *Metabolitos primarios y secundarios de las plantas*. Obtenido de <https://prezi.com/hmj1ckp7xv1n/metabolitos-primarios-y-secundarios-de-las-plantas>
- Nutrición Personalizada. (2010). *Fitoquímicos, los componentes químicos de las plantas*. Obtenido de <https://nutricionpersonalizada.wordpress.com/2010/07/27/fitoquimicos/>
- Ñuñez, C. E. (2008). Obtenido de Solventes y solubilidades de sustancias orgánicas: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/51comentariosobresolventesysolubilidades.pdf>
- Pila, A. (2015). *Fenoles naturales*. Obtenido de Universidad Central del Ecuador: <http://med.se-todo.com/himiya/3875/index.html>
- Reduca. (2011). *Reduca (Biología)*. Curso de cromatograma de líquidos de alta resolución (HPLC). Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/277157909\\_Curso\\_de\\_cromatografia\\_de\\_liquidos\\_de\\_alta\\_resolucion\\_HPLC\\_Practicas\\_de\\_laboratorio\\_y\\_cuestiones\\_teoricopracticas\\_Parte\\_III\\_Practica\\_de\\_laboratorio\\_optimizacion\\_en\\_la\\_separacion\\_de\\_compuestos\\_semejantes](https://www.researchgate.net/publication/277157909_Curso_de_cromatografia_de_liquidos_de_alta_resolucion_HPLC_Practicas_de_laboratorio_y_cuestiones_teoricopracticas_Parte_III_Practica_de_laboratorio_optimizacion_en_la_separacion_de_compuestos_semejantes)
- Rodas. (s.f.). Obtenido de Extracción líquido-líquido: [https://rodas5.us.es/file/23a16560-123f-bec5-ec5b-44a3042a281d/2/laboratotio\\_quimica\\_organica\\_SCORM.zip/pagina\\_16.htm](https://rodas5.us.es/file/23a16560-123f-bec5-ec5b-44a3042a281d/2/laboratotio_quimica_organica_SCORM.zip/pagina_16.htm)
- Rodríguez, J. J. (2014). *Análisis de polifenoles en vinos*. Obtenido de Triplenlace Química: <https://triplenlace.com/2014/12/27/analisis-de-polifenoles-en-vinos/>
- Sadek, P. C. (2002). Eluotropic series and solvent strength parameters. En J. & Wiley (Ed.), *The HPLC Solvent Guide* (2a ed., págs. 46-47). U.S.





- Shini, I. P. (2015). *Autorstream*. Obtenido de Cromatografía: <http://www.authorstream.com/Presentation/indirapriyadarshini-2024652-column-chromatography>
- Soto, M. Q. (2013). *Metabolitos secundarios y ruta del ácido shikimico*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/maryluz/clase-de-metabolitos-secundarios-y-ruta-de-acido-shikimico-por-qf-maril-roxana-soto-vsquez>
- Taiz, E., & Zeiger, L. (2006). Ruta mevalónica de los Terpenos. En Universitat Jaume I (Ed.), *Fisiología Vegetal* (1ra ed., págs. 583-584).
- UCDAVIS (University of California). (2017). *CHEMISTRY LIBRETEXTS*. Recuperado el 2017 de 05 de 14, de Thin Layer Chromatography: [https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Lab\\_Techniques/Thin\\_Layer\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography)
- UCDAVIS (University of California). (2017). *Thin Layer Chromatography*. Obtenido de CHEMISTRY; LibreTexts: [https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Lab\\_Techniques/Thin\\_Layer\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography)
- Universidad Nacional de Colombia. (2016). *Desmodium adscendens*. Obtenido de [biovirtual.unal.edu.co](http://www.biovirtual.unal.edu.co): <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=38839>
- Valcárcel Cases, M., & Gómez Hens, A. (1998). *Técnicas Analíticas de Separación*. En Reverté S.A. (Ed.) *Cromatografía de Columna* (págs. 437-439). Alemania.
- Vázquez, A., Alvarez, E., López, J., Wall, A., & Rosa, L. A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*, VI(2), 84-87.
- Velasco, D. (1992). *Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química*. Obtenido de [http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia\\_tipus.html](http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html)
- Venereo, J. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana Med Milit*, 31(2), 126-133.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. En Springer (Ed.). Alemania.
- Waksmundzka, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). Normal-phase planar chromatography & Solvent Properties and Classification. En T. & Group (Ed.), *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (págs. 136-138). U.S.
- Wu, Z., Gao, W., Phelps, M., Wu, D., Miller, D., & Dalton, J. (2004). *Favorable effects of weak Acids on Negative-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Obtenido de US National Library of Medicine National Institutes of Health: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104782/>



## ANEXOS

## ANEXO A

ENVASADO DE EXTRACTOS					
CÓDIGO	PARTE USADA	N° VIAL	PESO VIAL VACÍO	PESO VIAL + EXTRACTO	mg EXTRACTO
ZAMORA #1	HOJAS	1	2,6977g	2,7033g	5,6mg
		2	2,7031g	2,7245g	21,4mg
		3	2,6552g	2,7046g	49,4mg
		4	2,7214g	2,9233g	201,80mg
		5	2,7004g	3,2113g	510,90mg
ZAMORA #2		1	2,6852g	2,6919g	6,8mg
		2	2,6971g	2,7177g	20,6mg
		3	2,7208g	2,7728g	52mg
		4	2,6984g	2,8997g	201,30mg
		5	2,7117g	2,9117g	200mg
		6	2,6777g	3,1793g	501,60mg
ZAMORA #3		1	2,7280g	2,7336g	5,6mg
		2	2,7007g	2,7214g	20,7mg
		3	2,6836g	2,7356g	52mg
		4	2,7139g	2,7669g	52,9mg
		5	2,7034g	3,2077g	504,20mg
ZAMORA #4		1	2,6696g	2,6745g	4,9mg
		2	2,7300g	2,7350g	5 mg
		3	2,7145g	2,7344g	19,9mg
		4	2,7102g	2,7607g	50,5mg
	5	2,7222g	2,9224g	200,2mg	
	6	2,6801g	2,8814g	201,2mg	
ZAMORA #5	1	2,7111g	2,7161g	5mg	
	2	2,6725g	2,6785g	6mg	
	3	2,7130g	2,7330g	20mg	
	4	2,7115g	2,7321g	20,6mg	
	5	2,6819g	2,7336g	51,7mg	
	6	2,6567g	2,7093g	52,6mg	
ZAMORA #6	1	2,7200g	2,7256g	5,6mg	
	2	2,6707g	2,6913g	20,6mg	
	3	2,6772g	2,7279g	50,7mg	
	4	2,6855g	2,8859g	200,4mg	
	5	2,6884g	3,1238g	435,4mg	
ZAMORA #7	1	2,6891g	2,6948g	5,6mg	
	2	2,7103g	2,7312g	20,9mg	
	3	2,7069g	2,7580g	51,1mg	
	4	2,7200g	2,9218g	201,8mg	
	5	2,7179g	3,2132g	495,3mg	
ZAMORA #8	1	2,7199g	2,7252g	5,3mg	
	2	2,7116g	2,7327g	21,1mg	
	3	2,6951g	2,7460g	50,9mg	
	4	2,6882g	2,8884g	200,2mg	
	5	2,6997g	3,2075g	507,8mg	
ZAMORA #9	1	2,7014g	2,7070g	5,60mg	
	2	2,6945g	2,7149g	20,4mg	
	3	2,7067g	2,7570g	50,3mg	
	4	2,7183g	2,9193g	201mg	
	5	2,6679g	3,1692g	501,30mg	
ZAMORA #10	1	2,7094g	2,7145g	5,1mg	
	2	2,7102g	2,7312g	21mg	



		3	2,7283g	2,7787g	50,4mg
		4	2,7051g	2,9079g	202,8mg
		5	2,6934g	3,1944g	501mg
ZAMORA #11		1	2,7154g	2,7213g	5,9mg
		2	2,7328g	2,7532g	20,4mg
		3	2,6962g	2,7474g	51,2mg
		4	2,7902g	2,9902g	200mg
		5	2,7155g	3,2278g	512,3mg
ZAMORA #12		1	2,7225g	2,7280g	5,5mg
		2	2,7083g	2,7291g	20,8mg
		3	2,7182g	2,7684g	50,2mg
		4	2,6842g	2,8845g	200,3mg
		5	2,6984g	3,1999g	501,5mg
ZAMORA #13		1	2,7082g	2,7134g	5,2mg
		2	2,6818g	2,7017g	19,90mg
		3	2,7024g	2,7537g	51,30mg
		4	2,6941g	2,8998g	205,7mg
		5	2,6828g	3,1833g	500,5mg
ZAMORA #14		1	2,6374g	2,6430g	5,6mg
		2	2,6777g	2,6980g	20,3mg
		3	2,6686g	2,7192g	50,6mg
		4	2,6923g	2,8943g	202mg
		5	2,7085g	3,2090g	500,5mg

**Anexo A. Envasado de extractos**

## ANEXO B

<b>DESCRIPCIÓN:</b>	<b>COLUMNA: 2</b> <b>POLARIDAD: POLAR</b> <b>CARGA DE COLUMNA: 2,5%</b> <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES: 2mg/ml</b> <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN: AE-Ac.Fórmico- Ac. Acético-METOH-Agua (80-5-1-10-10)</b> <b>REVELADOR: PRODUCTOS NATURALES</b>		
<b>CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS</b>
1-22	-----	F1	-----
23-27	0,99	F2	0,99
28-42	0,99 0,95 0,92	F3	0,99 0,95 0,92
43	0,99 0,95 0,92 0,70	F4	0,99 0,95 0,92 0,70
44-45	0,95 0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61	F5	0,95 0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61
46-48	0,95 0,92 0,88 0,80 0,76	F6	----- ----- 0,88 0,80 0,76



	0,70 0,61 0,53		0,70 0,61 0,53
49-53	0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42	F7	---- ---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53 0,42
54-57	0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,19	F8	---- ---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53 0,42 ----
58-63	0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F9	---- ---- 0,70 0,61 0,53 0,42 ---- 0,26 0,19
64-72	0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F10	0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19
73-95	0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F11	---- ---- ---- ---- 0,26 0,19
96-125	0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F12	---- ---- ---- 0,26 0,19 0,12
126-134	0,26 0,19 0,12	F13	---- 0,19 ----
135-136	0,19 0,12 ----	F14	0,19 ---- 0,04
137-139	0,19 0,04	F15	0,19 0,04
140-154	0,04	F16	0,04

**Anexo B.** Documentación de los Rf en la Columna Polar 2



ANEXO C

DESCRIPCIÓN:	<b>COLUMNA: 4</b> <b>POLARIDAD: APOLAR</b> <b>CARGA DE COLUMNA: 2,5%</b> <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES: 2mg/ml</b> <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN: Cloroformo- ETOH- Agua- Ác. Fórmico- Ác. Acético (51:34:9:5:1)</b> <b>REVELADOR: PRODUCTOS NATURALES</b>		
CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES	RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES	CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS	RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS
1-21	-----	F1	-----
22-40	0,99	F2	0,99
41-44	0,99 0,92 0,68 0,50	F3	0,99 0,92 0,68 0,50
45-55	0,92 0,88 0,80 0,74 0,68 0,60 0,50	F4	0,92 ---- ---- ---- 0,68 0,60 0,50
56-60	0,68 0,50 0,35 ----	F5	0,68 0,50 0,35 0,12
61-65	0,68 0,50 0,35 0,26 0,19 0,12	F6	---- 0,50 0,35 0,26 0,19 0,12
66-69	0,50 0,35 0,26 0,19 0,12	F7	0,50 0,35 0,26 0,19 0,12
70	0,68 0,50 0,35 0,26 0,19 ----	F8	---- 0,50 0,35 0,26 0,19 0,12
71-75	0,35 0,26 0,19 0,12	F9	---- 0,26 0,19 ----
76-86	0,74 0,68 0,50 0,35 0,26 0,19 0,12	F10	---- ---- 0,50 0,35 0,26 0,19 0,12
87-101	0,26 0,19 0,12	F11	0,26 0,19 0,12



102-109	0,26 0,19 0,12 ----	F12	0,26 0,19 ----
110-119	0,26 0,19 0,12 ----	F13	---- 0,19 0,12 0,09
120-127	0,19 0,12 0,09	F14	0,19 0,12 0,09
128-130	0,26 0,19 ---- ----	F15	---- 0,19 0,12 0,09
131-134	0,90 0,60 0,50 0,26 0,19 ---- ----	F16	---- ---- ---- ---- ---- 0,12 0,09
135-139	0,26 0,19 0,12 ----	F17	---- ---- 0,12 0,09
140-154	-----	F18	----

**Anexo C. Documentación de los Rf en la Columna Apolar 4**

**ANEXO D**

<b>DESCRIPCIÓN:</b>	<b>COLUMNA: 5</b> <b>POLARIDAD:</b> POLAR <b>CARGA DE COLUMNA:</b> 2,5% <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES:</b> 2mg/ml <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN:</b> AE-Ac.Fórmico- Ac. Acético-METOH-Agua (80-5-1-10-10) <b>REVELADOR:</b> PRODUCTOS NATURALES		
<b>CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS</b>
1-18	----	F1	----
19	0,99	F2	0,99
20-21	----	F3	----
22-23	0,99	F4	0,99
24-28	0,99 0,95 0,92	F5	0,91 ---- 0,92
29-36	0,99 0,92	F6	0,99 0,92
37-38	0,99 0,95 ----	F7	0,99 0,95 0,92
39-41	0,95 0,92	F8	0,95 0,92
42-44	0,99 0,95 0,92 ---- ---- ----	F9	---- ---- 0,92 0,88 0,80 0,76



	0,70		0,70
45-48	0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53	F10	0,92 0,88 0,80 0,76 ---- 0,61 0,53
49-56	0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53	F11	---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53
57-73	0,70 0,61 0,53 0,42	F12	0,70 0,61 0,53 ----
74-96	0,76 0,70 0,61 0,53 0,42	F13	---- 0,70 0,61 0,53 0,42
97-112	0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,26 0,19	F14	---- 0,70 0,61 0,53 0,42 0,26 ----
113-115	0,70 0,61 0,53 0,42 0,26 0,19	F15	0,70 0,61 0,53 0,42 0,26 0,19
116-118	0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F16	---- ---- ---- ---- 0,26 0,19 ----
119-121	0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F17	---- ---- ---- 0,26 0,19 ----
122 y 124	0,53 0,42 0,26 0,19 0,12	F18	---- ---- ---- ---- ----
123	0,26 0,19	F19	---- ----
125-134	0,26	F20	0,26
135-154	0,04	F21	0,04

**Anexo D.** Documentación de los Rf en la Columna Polar 5 con carga de columna del 2,5%



ANEXO E

DESCRIPCIÓN:	<b>COLUMNA:</b> 6 <b>POLARIDAD:</b> POLAR <b>CARGA DE COLUMNA:</b> 2,5% <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES:</b> 2mg/ml <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN:</b> AE-Ac.Fórmico- Ac. Acético-METOH-Agua (80-5-1-10-10) <b>REVELADOR:</b> PRODUCTOS NATURALES		
CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES	RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES	CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS	RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS
1-5	0,97	F1	----
6-20	----	F2	----
20-23	0,99	F3	0,99
24-28	----	F4	----
29-37	0,99	F5	0,99
38-39	0,99 0,95 0,92	F6	0,91 ---- 0,92
40-42	0,99 0,92	F7	0,99 0,92
43	0,99 0,95 ----	F8	0,99 0,95 0,92
44-45	0,95 0,92	F9	0,95 0,92
46-48	0,99 0,95 0,92 ---- ---- ----	F10	---- ---- 0,92 0,88 0,80 0,76 0,70
49-56	0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53	F11	0,92 0,88 0,80 0,76 ---- 0,61 0,53
57-64	0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53	F12	---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53
65-69	0,70 0,61 0,53 0,42	F13	0,70 0,61 0,53 ----
70-79	0,76 0,70 0,61 0,53 0,42	F14	---- 0,70 0,61 0,53 0,42
80-97	0,76 0,70 0,61 0,53 0,42	F15	---- 0,70 0,61 0,53 0,42





	0,26		0,26
98	0,70 0,61 0,53 0,42 0,26 0,19	F16	0,70 0,61 0,53 0,42 0,26 0,19
99-112	0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F17	---- ---- ---- ---- 0,26 0,19 ----
113-119	0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F18	---- ---- ---- 0,26 0,19 ----
120-125	0,53 0,42 0,26 0,19 0,12	F19	---- ---- ---- 0,19 0,12
126-128	0,26 0,19	F20	---- 0,19
129-134	0,26 0,04	F21	---- 0,04
135-144	0,04	F22	----
145-154	----	F23	----

**Anexo E.** Documentación de los Rf en la Columna Polar 6 con carga de columna del 2,5%

#### ANEXO F

<b>DESCRIPCIÓN:</b>	<b>COLUMNA:</b> 8 <b>POLARIDAD:</b> POLAR <b>CARGA DE COLUMNA:</b> 5% <b>CONCENTRACIÓN DE LA UNIÓN DE FRACCIONES:</b> 2mg/ml <b>FASE MÓVIL DE ELUCIÓN:</b> AE-Ac.Fórmico- Ac. Acético-METOH-Agua (80-5-1-10-10) <b>REVELADOR:</b> PRODUCTOS NATURALES		
<b>CÓDIGO FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES INDIVIDUALES</b>	<b>CÓDIGO DE FRACCIONES UNIDAS</b>	<b>RF DE LAS FRACCIONES UNIDAS</b>
1-21	----	F1	----
22-24	0,99	F2	0,99
25-41	0,99 0,95 0,92	F3	0,99 0,95 ----
42-45	0,95 0,92	F4	0,95 0,92
46-52	0,95 0,92 0,80 0,76 0,70 0,61	F5	0,95 0,92 0,80 0,76 0,70 0,61
53-71	0,92	F6	----



	0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42		---- ---- 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42
72-96	0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,19	F7	---- ---- ---- 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 ---- ----
97-132	0,92 0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F8	---- ---- ---- 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 ---- 0,26 0,19
133-137	0,92 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19 0,12	F9	---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53 ---- ---- 0,26 0,19 ----
138-148	0,88 0,80 0,76 0,70 0,61 0,53 0,35 0,26 0,19 0,12	F10	---- ---- ---- 0,70 0,61 0,53 ---- 0,26 0,19 ----
149-153	0,76 0,70 0,61 0,53 0,42 0,35 0,26 0,19	F11	---- 0,70 0,61 0,53 ---- ---- 0,26 0,19
154	----	F12	----

**Anexo F.** Documentación de los Rf en la Columna Polar 8 con carga de columna al 5%